



Gina Filipa Mendes Figueira

Validação da inexistência de resíduos de leite numa linha de enchimento

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar na área de especialização
Qualidade Alimentar

Orientador: Engenheiro Artur Jorge Caetano Ferreira da
Refrige S.A

Coorientador: Professor Doutor Fernando José Lidon da
Faculdade de Ciências e Tecnologia



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
2013

Validação de resíduos de leite numa linha de enchimento Copyright de Gina Filipa Mendes Figueira, FCT/UNL e UNL.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

A todos aqueles que me acompanharam ao longo destes 4 anos de estudo.

Ao meu orientador, Engenheiro Artur Ferreira, pela sua disponibilidade, confiança, amizade, dedicação, competência e orientação prestada na colaboração na realização do trabalho. Assim como toda a ajuda na deliberação dos problemas que foram surgindo ao longo do caminho.

Ao meu coorientador de estágio, Professor Doutor Fernando Lidon pela sua disponibilidade, apoio e orientação científica demonstrada no desenvolvimento do trabalho, bem como toda a aprendizagem que me proporcionou ao longo de todo o curso.

Aos meus amigos pelo constante apoio e incentivo demonstrado durante a elaboração deste trabalho.

À família um especial e eterno agradecimento.

A todos um muito Obrigado!

Resumo

A alergia alimentar pode ser definida como uma reação adversa a um antígeno alimentar mediada por mecanismos imunológicos. É um problema nutricional que tem aumentado nas últimas décadas, provavelmente devido a uma maior exposição da população a um número crescente de alérgenos alimentares disponíveis. Esta tem vindo a tornar-se um problema de saúde à escala global, que no mundo tende a aparecer associado a um impacto negativo e significativo na qualidade de vida. De entre os alimentos que usualmente são mais citados como indutores de alergias alimentares destaca-se o leite, ovos, amendoim, castanhas, camarão, peixe e soja. Nestes produtos, os principais alérgenos alimentares identificados são de natureza proteica. Assim, a investigação nesta área científica vem progressivamente adquirindo uma relevância progressiva. Neste enquadramento, o objetivo deste estudo centra-se na revisão atualizada das boas práticas de fabrico aquando do enchimento de um sumo com leite, assim como de todos os cuidados a ter numa linha de produção com esse alérgeno. Acresce ainda o estudo de todos os meios de controlo de qualidade para averiguar se ficaram resíduos de leite ao longo do processamento, para se evitarem contaminações cruzadas na mudança de um sumo com leite para um outro produto isento de leite. Neste enquadramento apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos na validação dos resíduos de leite na Companhia Coca-Cola. Esta validação é realizada internamente e externamente. Internamente é através de um *kit* qualitativo, onde os resultados obtidos foram negativos (< 5ppm) em todas as amostras recolhidas.

Palavras-chave: Alergia; Antígeno; Alérgico; Boas práticas de fabrico; Contaminação cruzada.

Abstract

Food allergy can be defined as an adverse reaction to food antigen-mediated by immunologic mechanisms. It is a nutritional problem which is growing in the recent decades, mostly due to higher exposure to a larger number of available food allergens. This has become a health problem worldwide and is increasingly being associated with significant negative impacts on the quality of life. Foods most commonly referred as being a cause of food allergy are milk, eggs, peanuts, nuts, shrimp, fish and soy. Accordingly, the main food allergens are of protein acetous nature. Nevertheless, it is being increasingly considered that research focused in the reduction of the damage caused by foods containing allergens is of most importance. This study aims to update good manufacturing practices during the filling of a juice with milk as well as all the precautions that must be followed in the production line implicating that allergen. Additionally, all the quality control means, to determine if there are milk residues over processing will be also considered, to avoid cross contamination when changing from a juice with milk to a product without milk. In this framework, data about the validation of milk residues obtained in the Coca-Cola Company are presented and discussed. This validation is performed internally and externally. Is internally through a qualitative kit, where the results were negative (<5ppm) in all the collected samples.

Keywords: Allergy; Antigen; Allergen, Good manufacturing practices; Cross contamination.

Índice

Índice de Figuras	VII
Índice de Tabelas	VIII
Lista de abreviaturas	IX
1. Introdução	1
1.1 Alergias alimentares <i>ou</i> intolerâncias alimentares	2
1.2 Alergenos	6
1.3 Métodos de detecção de alergenos	8
1.4 Alergia ao leite de vaca	12
1.5 Legislação de alergenos alimentares	16
1.6 Coca-Cola	18
1.6.1 Refrige S.A	20
1.7 Caracterização do produto <i>Minute Maid</i>	22
1.8 Identificação e caracterização do alergeno	23
1.9 Controlos, necessários para a gestão eficaz deste alergeno na fábrica	24
1.9.1 Fornecedores	30
1.9.2 Projeto de engenharia e manutenção	30
1.9.3 Controlo de qualidade da matéria-prima	30
1.9.4 Armazenagem dos concentrados	31
1.9.5 Manuseamento da matéria-prima	32
1.9.6 Controlo de pó e alergenos	32
1.9.7 Produção	33
1.9.8 Armazenamento do produto final	34
2. Objetivos	36
3. Metodologia para controlo de alergenos	37
3.1 Material, equipamento e reagentes	41
3.2 Modo operativo	42
3.2.1 Águas	42
3.2.2 Zaragatoas	42
4. Resultados	44
5. Discussão	52
6. Conclusão	53
7. Bibliografia	54

Índice de Figuras

Figura 1.1: Classificação de alergias alimentar e intolerância alimentar de acordo com a academia europeia de alergias e imunologia clinica	3
Figura 1.2: Principais elementos de uma reacção mediada por IgE	4
Figura 1.3: Representação dos 8 alimentos responsáveis, por 90% das alergias alimentares.....	6
Figura 1.4: Representação do fluxograma de validação de resíduos do alergeno seguido na fábrica Refrige S.A.	9
Figura 1.5: Distribuição das proteínas do leite de vaca	12
Figura 1.6: John S. Pemberton	18
Figura 1.7: Representação de algumas bebidas fabricadas na Refrige S.A	21
Figura 1.8: <i>Minute Maid duofrutas Tropical e Mediterrâneo</i>	22
Figura 1.9: Representação do fluxograma de enchimento (resumido) do produto em causa	29
Figura 1.10: Representação da área de armazenagem dos sacos de leite em pó	31
Figura 1.11: Representação do instrumento de corte específico para a utilização em matérias primas alergénicas	32
Figura 1.12: Exemplo de um contentor devidamente identificado	34
Figura 1.13: Colocação correta das paletes do produto em causa	35
Figura 3.1: Representação esquemática do método utilizado	38
Figura 3.2: Ilustração do resultado positivo (com duas linhas vermelhas) e de um resultado negativo (apenas uma linha vermelha)	42

Índice de Tabelas

Tabela 1.1: Sintomas na alergia às proteínas do leite de vaca	14
Tabela 1.2: Representação simplificada, dos perigos e das medidas de controlo que foram adicionadas ao plano de HACCP	27
Tabela 3.1: Representação dos pontos de recolha das amostras para controlo de alergenos	38
Tabela 4.1: Representação dos valores limite estabelecidos, pela companhia Coca-Cola, laboratório externo, e método utilizado interno com a técnica de <i>Elisa</i>	44
Tabela 4.2: Resultados na Sala de Xaropes após o primeiro enchimento do sumo com leite	44
Tabela 4.3: Resultados na Sala de Enchimento após o primeiro enchimento do sumo com leite.....	45
Tabela 4.4: Resultados na Sala de CIP após o primeiro enchimento do sumo com leite.....	46
Tabela 4.5: Resultados dos produtos após o primeiro enchimento do sumo com leite	46
Tabela 4.6: Representação dos novos pontos de recolha de amostras para a validação de resíduos de leite	47
Tabela 4.7: Resultados ao longo do ano de 2011, da validação de resíduos de leite	48
Tabela 4.8: Resultados ao longo do ano de 2012, da validação de resíduos de leite	49
Tabela 4.9: Resultados da validação anual (do ano 2011 e 2012) da Refrige e do laboratório externo	50

Lista de abreviaturas

OMA - Organização Mundial de Alergias

IgE - Imunoglobulina E

NOEL - Nível de efeito não observável

DNA - Ácido desoxirribonucleico

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

EUA – Estados Unidos da América

RAST - Teste rádio alérgico absorvente

HACCP - *Hazard Analysis and Critical Control Point*

CIP - *Clean in Place*

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

1. Introdução

Os efeitos adversos que alguns alimentos podem causar quando consumidos, têm vindo a aumentar, sendo estes conhecidos e relatados ao longo das últimas centenas de anos (Carvalho, 2001). Esses efeitos podem distinguir-se entre alergias e intolerâncias alimentares, é de extrema importância saber diferenciá-las, embora possam ser facilmente confundidas, em termos científicos são totalmente diferentes. Em traços gerais, e apesar do progresso da imunopatologia e das ciências biomédicas, existem muitos alergenógenos presentes em alimentos, que ainda não foram identificados ou caracterizados, que se transformam em alergias alimentares.

Assim, vem sendo atribuída uma relevância crescente, à sensibilização do consumidor (através dos média, grupos de consumidores e portais de internet reguladores), ao aumento do número de produtos associados com alergenógenos e no que diz respeito à produção, à rotulagem e à contaminação cruzada.

Equacionando as indústrias de sumos e refrigerantes, aquando da produção de um produto com leite, são essenciais alguns cuidados, desde a receção das matérias-primas até ao armazenamento do produto final, sendo esses cuidados caracterizados e discutidos neste estudo. Como corolário, abordam-se as alergias associadas às proteínas da vaca, de forma a determinar estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento, fundamentais para o bom prognóstico desta patologia. Neste contexto, apresenta-se ainda um estudo, recorrendo a um *Kit* de alergenógenos, para aferir se após enchimento de um produto com leite da empresa Coca Cola, a par da higienização dos equipamentos utilizados, existem ou não resíduos de leite.

1.1 Alergias alimentares ou intolerâncias alimentares

As alergias alimentares afetam cerca de 2-4% da população (Kanny *et al.*, 2001; Zuberbier *et al.*, 2004), verificando-se que na Europa o número estimado que afeta as crianças é de 5-8%. As reações alérgicas a alimentos também representam uma alta proporção de admissões aos hospitais para reações alérgicas agudas (Worm *et al.*, 2010). Isto significa que numa população com 500 milhões, nos 27 Estados Membros da UE, cerca de 10-20 milhões de pessoas sofrem de uma alergia alimentar. No entanto, o número dos que acreditam que têm uma alergia alimentar é consideravelmente mais elevada em cerca de 20% da população (Rona *et al.*, 2007), aspeto que constitui um importante problema de saúde pública, embora o percentual em risco de uma reacção grave com risco de vida seja consideravelmente mais baixa.

Segundo a Organização Mundial de Alergias (OMA), as alergias alimentares são definidas como reações de hipersensibilidade iniciadas por mecanismos imunológicos específicos. É fundamental fazer a distinção entre as alergias alimentares e outras reações de hipersensibilidade alimentar não alérgicas, como por exemplo, as intolerâncias alimentares (Teixeira, 2010). De facto, equivocadamente as intolerâncias alimentares, por vezes, têm sido apontadas como sendo alergias alimentares (Angelis, 2006).

A intolerância alimentar ocorre quando o organismo não consegue digerir adequadamente um componente ou parte de um alimento. É consequência de deficiências enzimáticas, redução da superfície de absorção do intestino ou infeções (Luiz *et al.*, 2012). Desta forma, intolerância alimentar refere-se a reações adversas aos alimentos, que não envolvem o sistema imunitário e não é geralmente o resultado de toxicidade inerente, mas de alguma característica do alimento (*i.e.*, atividade farmacológica), o indivíduo afetado (*i.e.*, deficiência enzimática) ou onde a causa é desconhecida. Embora não seja geralmente com risco de vida, tais reações podem fazer o doente sentir um extremo mal-estar e pode ter um grande impacto na vida profissional e social. Devido à natureza de intolerâncias alimentares, os sintomas não podem ser definidos com precisão. Podem ocorrer muito rapidamente e imitar uma reacção alérgica (*i.e.*, aminas biogénicas), mas também se podem desenvolver ao longo de muitas horas, até que a substância nociva seja removida (*i.e.*, intolerância à lactose). Muitas vezes, os sintomas também são vagos e não são facilmente diagnosticados. Pessoas com intolerância alimentar têm que adaptar a sua alimentação à respectiva intolerância individual (EFSA Panel on Dietetic Products, 2010).

A palavra alergia é proveniente do grego *allan* (outro) e *ergon* (trabalho) (Fernandes, 2005). Alergia alimentar refere-se a uma resposta imunitária inapropriada a um constituinte alimentar (quase sempre uma proteína), causando esse alimento uma reacção alérgica, quando é ingerido novamente. A quantidade de proteína relatada para provocar uma reacção alérgica pode variar entre um décimo de miligrama e algumas gramas, e, por vezes, dezenas de gramas. É considerável a variabilidade individual existir entre indivíduos alérgicos alimentares. No entanto, estes valores não estão bem definidos para muitos alimentos alergénicos. Ao nível da população alérgica, menor é a dose, menos sintomas graves e, menor a proporção de doentes reativos. No entanto, existe uma considerável incerteza quanto à quantidade mais baixa à qual os doentes vão reagir, a proporção de doentes que reagem a uma dose definida, assim como a relação entre a

dose e a gravidade para qualquer dado indivíduo. Avaliando o impacto na saúde pública das pequenas quantidades de alergenios residuais que não fazem parte da formulação de um produto alimentar fabricado, mas pode estar presente devido ao processo de produção, portanto, representa um desafio considerável para arriscar gestores nas autoridades públicas e indústrias.

Uma abordagem estruturada, para avaliar o risco de alergenios alimentares para pessoas que sabem que são alérgicas, exige como primeiro passo, que a medida experimental da dose mais elevada não possa causar uma reacção (o nível de efeito não observável, ou NOEL), numa população que é tão representativa quanto possível da população alérgica relevante, utilizando um protocolo normalizado. No entanto, tais abordagens experimentais têm várias limitações. Estes incluem a viabilidade de desafios alimentares num número suficiente de pessoas, os critérios para a inclusão em tais estudos, a medida em que os desafios numa clínica podem reproduzir a resposta de indivíduos de vida livre, e as diferenças entre os alimentos reais e as matrizes utilizadas para mascarar o alimento alergénico. Em última instância, estes estudos não permitem uma estimativa directa das quantidades de alergenio que possam provocar reacções na pequena proporção da população que reage a doses mais baixas do que qualquer testado (Crevel *et al.*, 2007).

Desta forma, os alimentos podem produzir muitos tipos diferentes de reacções alérgicas, mas a partir de uma perspectiva de segurança de saúde pública e alimentar, com o maior impacto são aqueles em que o sistema imunitário produz os anticorpos para as proteínas alimentares IgE e as suas reacções são a principal preocupação desta orientação. Desta forma, é necessário saber diferenciar alergia alimentar de intolerância alimentar, por exemplo a intolerância à lactose, que não envolve o sistema imunitário, (figura 1.1).

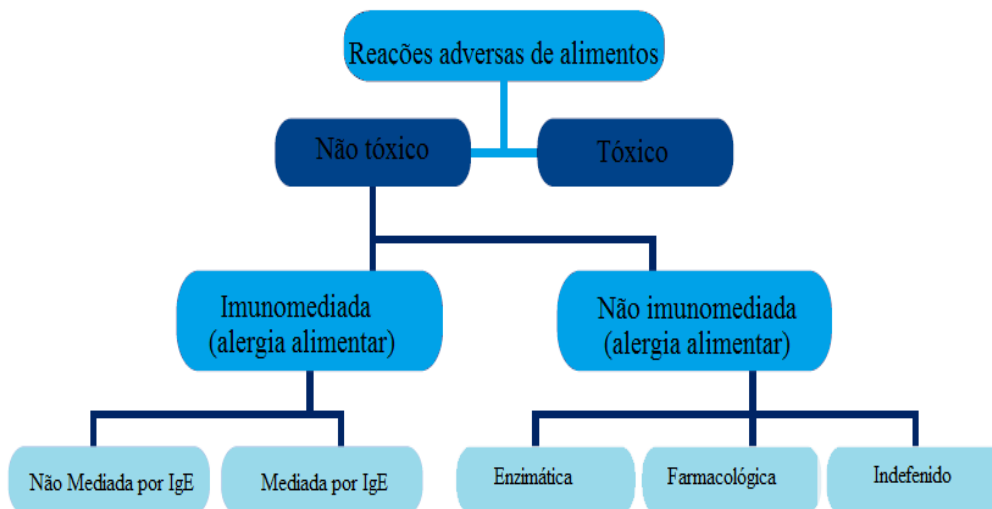


Figura 1.1: Classificação de alergias alimentar, de acordo com a academia europeia de alergias e imunologia clinica, (EAACI, 2004).

Neste contexto, uma alergia alimentar está relacionada com o aparecimento de reacções adversas, instantaneamente, ou até 24 horas após o consumo de um determinado alimento, tendo como mediador o sistema imunológico. Note-se que os alergenios alimentares, na maioria dos casos, podem causar reacções após cozedura ou digestão. Em condições normais, o intestino constitui uma barreira que impede a absorção

da maioria das proteínas integrais, sendo necessária uma digestão prévia e subsequente transformação em partículas menores (nomeadamente aminoácidos), passíveis de absorção. Assim, para que uma reação alérgica a um alimento aconteça, as proteínas, ou outras moléculas grandes do alimento, devem ser absorvidas pelo trato gastrointestinal, interagir com o sistema imunológico e originar uma resposta, constituindo-se assim numa substância alergénica ou alergénio (Lidon e Silvestre, 2010).

As reações alérgicas englobam mecanismos imunológicos que podem, ou não, ser mediados pela IgE, normalmente associadas às alergias alimentares, e às reações de hipersensibilidade, tendo como característica a rápida libertação de mediadores como a histamina (Portero *et al.*, 2001). Sendo estas as alergias alimentares mediadas por IgE (figura 1.2), que causam de imediato sintomas e ou uma possível anafilaxia, e as não mediadas IgE, que causam reações com sintomas mais atrasados, ou uma combinação de ambos.

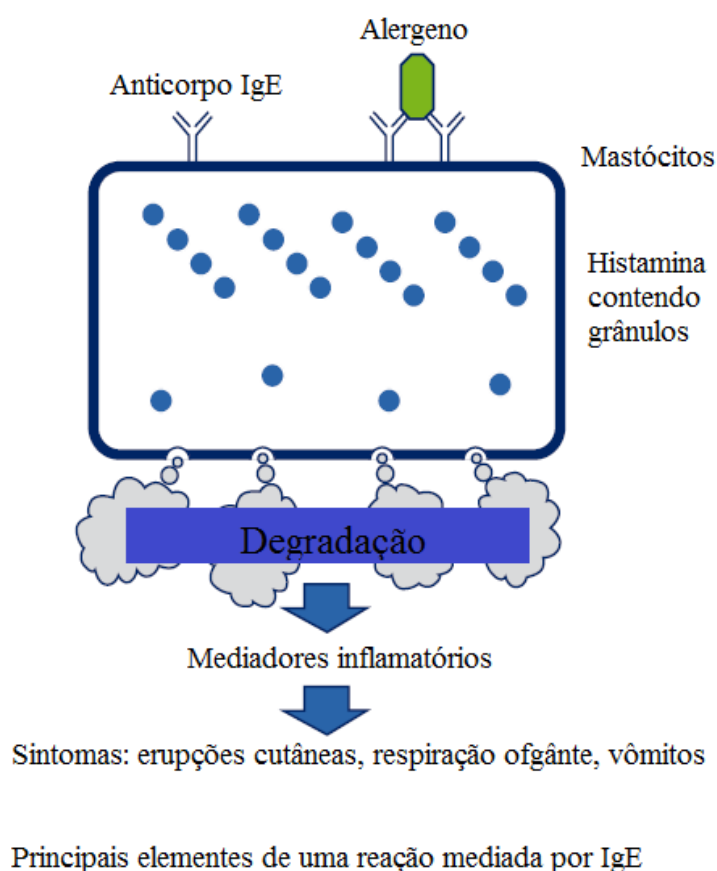


Figura 1.2: Principais elementos de uma reação mediada por IgE (Pérez, 2013)

Embora estas diferentes formas de alergia alimentar tenham apresentação clínica variável, elas provavelmente partilham uma fisiopatologia comum, com sensibilização alimentar do antígeno (Wang e Sampson, 2011). Assim, numa fase inicial, o mecanismo pelo qual se desenvolve um ataque alérgico típico requer o contacto com o alergénio, evoluindo então a consequente síntese de anticorpos produzidos por glóbulos brancos, que atuam normalmente para combater agentes patogénicos e neutralizar o alergénio.

Atente-se ainda que a alergia pode ser mediada por anticorpos ou por células com receptores específicos (Lidon e Silvestre, 2010).

As alergias alimentares são, na maioria dos casos, caracterizadas por um acréscimo na capacidade de os linfócitos B sintetizarem a imunoglobulina do isotipo IgE contra antígenos que penetram no organismo via inalação, ingestão ou pela pele (Moreira, 2006). Estas estão associadas a uma herança genética, à idade (sendo que, raramente aparecem na idade adulta, após os 40 anos), a hábitos alimentares e, por vezes, são ainda consequências de doenças infecciosas (Lidon e Silvestre, 2010). Por oposição, uma intolerância alimentar decorre de qualquer resposta anormal a um alimento ou aditivo, sem envolvimento dos mecanismos imunológicos (Luiz *et al.*, 2007).

O sistema imunológico possui mecanismos de defesa adaptativos, destacando-se a ação promovida pelos linfócitos e a produção de anticorpos específicos e inatos, nomeadamente, a proteção da pele, a acidez, as células envolvidas em processos fagócitos ou o lacrimejar (Lidon e Silvestre, 2010).

De facto, os problemas alérgicos promovidos por alimentos em crianças e jovens nas últimas décadas estão aumentado (Ferreira *et al.*, 2005), o que tem contribuído negativamente, e à escala global, para a qualidade de vida das populações (Lopes *et al.*, 2006). Note-se contudo que a prevalência de alergias alimentares também é maior nos primeiros anos de vida, afetando cerca de 6% das crianças com menos de 3 anos de idade. Contudo, na fase adulta, cerca de 2% da população possui alergias alimentares diversas (Lidon e Silvestre, 2010).

Assim o item “alergias alimentares” é bastante subjetivo, e pode compreender um enorme leque de factores, que envolvidos numa resposta anormal a algum ingrediente proteico de alimentos ingeridos, podem dever-se a processos imunológicos, herança genética ou a anormalidades metabólicas do organismo (Angelis, 2006).

1.2 Alergenos

Considera-se um alergeno qualquer substância com potencial para desencadear uma reação alérgica.

Devido às reações alérgicas começarem com o reconhecimento do alergeno (*i.e.*, uma proteína específica), qualquer processo que modifica a estrutura de uma proteína irá ter o potencial para afetar a sua alergenicidade. O processamento de alimentos induz várias alterações físicas, químicas e bioquímicas que são conhecidas por potencialmente alterar as características alergénicas das proteínas. Certos métodos de processamento de alimentos podem aumentar, reduzir ou eliminar o potencial alergénico do alimento. A remoção da fração da proteína do alimento pode reduzir a exposição a alergenos suficientemente para impedir reações alérgicas (por exemplo, óleos de sementes altamente refinados). Este é reconhecido pelas isenções concedidas pela legislação da rotulagem. No entanto, não há regras sobre como diferentes alimentos alergénicos respondem aos métodos de processamento físico (nomeadamente, processos de índole térmica ou mecânica), químicos ou bioquímicos. Consequentemente, a menos que exista evidência sólida de que um método de tratamento específico reduz a alergenicidade, deve presumir-se que o potencial alergénico de um alimento processado é idêntico ao da respectiva forma não processada (Thomas *et al.*, 2007).

Os alergenos alimentares mais comuns (figura 1.3), responsáveis por até 90% de todas as reações alérgicas (Adamo, 2005), estão associados a 8 tipos de alimentos (leite, ovo, amendoim, trigo, soja, peixe, frutos do mar e nozes).

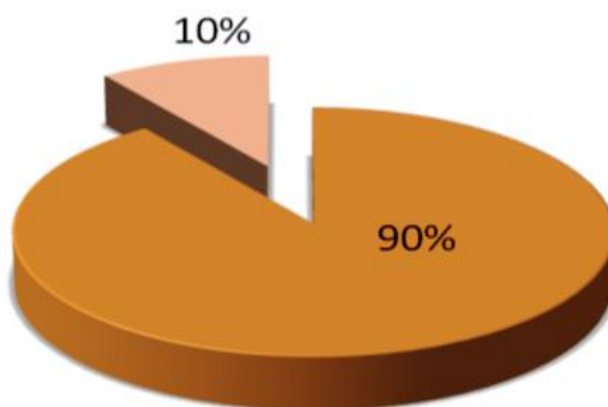


Figura 1.3: Representação dos 8 alimentos (leite, ovo, amendoim, trigo, soja, peixe, frutos do mar e nozes) responsáveis, por 90% das alergias alimentares (FAO,1995).

Aponte-se ainda que as frutas cruas e os vegetais são responsáveis pela síndrome alérgico oral, que afeta aproximadamente 50% dos adultos (Pereira, 2008).

Segundo o tipo de indução da reação alérgica ao alimento, os alergenos podem ser classificados como alergeno de classe I e alergenos de classe II.

Os alergenos de classe I correspondem às glicoproteínas estáveis ao calor, resistentes ao meio ácido e à proteólise. Estes induzem sensibilização alérgica via trato gastrointestinal podendo causar reações sistémicas. Esta classe de alérgénios é mais comum nas crianças e diz respeito a alérgénios alimentares

específicos, destacando-se a proteína do leite de vaca, o ovo de galinha, o amendoim, o peixe e o marisco (Ramesh, 2008).

Os alergenios de classe II compreendem as proteínas inaladas pela via respiratória, como é o caso do pólen com reatividade cruzada de alérgenos alimentares derivados de plantas, nomeadamente, frutas e vegetais crus (Ramesh, 2008). Note-se contudo que existem estudos recentes (Panzani, 2010) que contradizem esta formulação, apontando que a alergia ao pólen de árvores ciprestes não estava associada a alergia a alimentos de origem vegetal (pêssego, maçã, tomate e cereja). As reações cruzadas ocorrem quando duas proteínas compartilham parte de uma sequência de aminoácidos que contém um determinado antigénico / epítipo alérgico produzindo a manifestação clínica da respectiva reação alérgica (Ivanciuc *et al.*, 2009).

1.3 Métodos de detecção de alergen

A necessidade de uma metodologia adequada para a detecção de alérgenos alimentares tem vindo a aumentar rapidamente nos últimos anos, especialmente em resposta às exigências impostas pela legislação atual. A indústria alimentar tem vindo a abordar com especial interesse a necessidades de consumidores de alimentos alérgicos, não só sobre a rotulagem de alimentos adequados, mas também para minimizar as contaminações cruzadas entre alergen

Os requisitos necessários para a detecção de componentes alérgicos nos alimentos envolve uma apropriada especificidade e sensibilidade para detectar quantidades diminutas de alvo alergen, ou os marcadores correspondentes em matrizes alimentares complexas, incluindo alimentos processados. A determinação dos limites superiores para ingredientes alérgicos é um progresso importante para a protecção do consumido. No entanto, esses limites só são significativos no desenvolvimento de adequadas metodologias analíticas para verificar os componentes alérgicos (Crevel *et al.*, 2008).

A disponibilidade de métodos de detecção precisos e sensíveis para alergen alimentares é fundamental para a indústria de alimentos, para inspecionar e controlar respetivos processos de produção, e para assegurar a correta rotulagem dos seus produtos, num esforço que visa proteger os consumidores alérgicos (Monaci *et al.*, 2008).

A determinação dos níveis de transição a partir de um produto que contém um alergen a outro é crítico para avaliações quantitativas dos riscos de alergen. O estudo de validação deve ser concluído para confirmar que as práticas de troca que ocorrem entre receitas que contém um alergen específico e as que não contem são eficazes para controlar o risco. O estudo de validação deve seguir uma base, tendo para este enquadramento sido criado um pequeno fluxograma que leva a avaliação da validação, como todos os passos a seguir (figura 1.4).

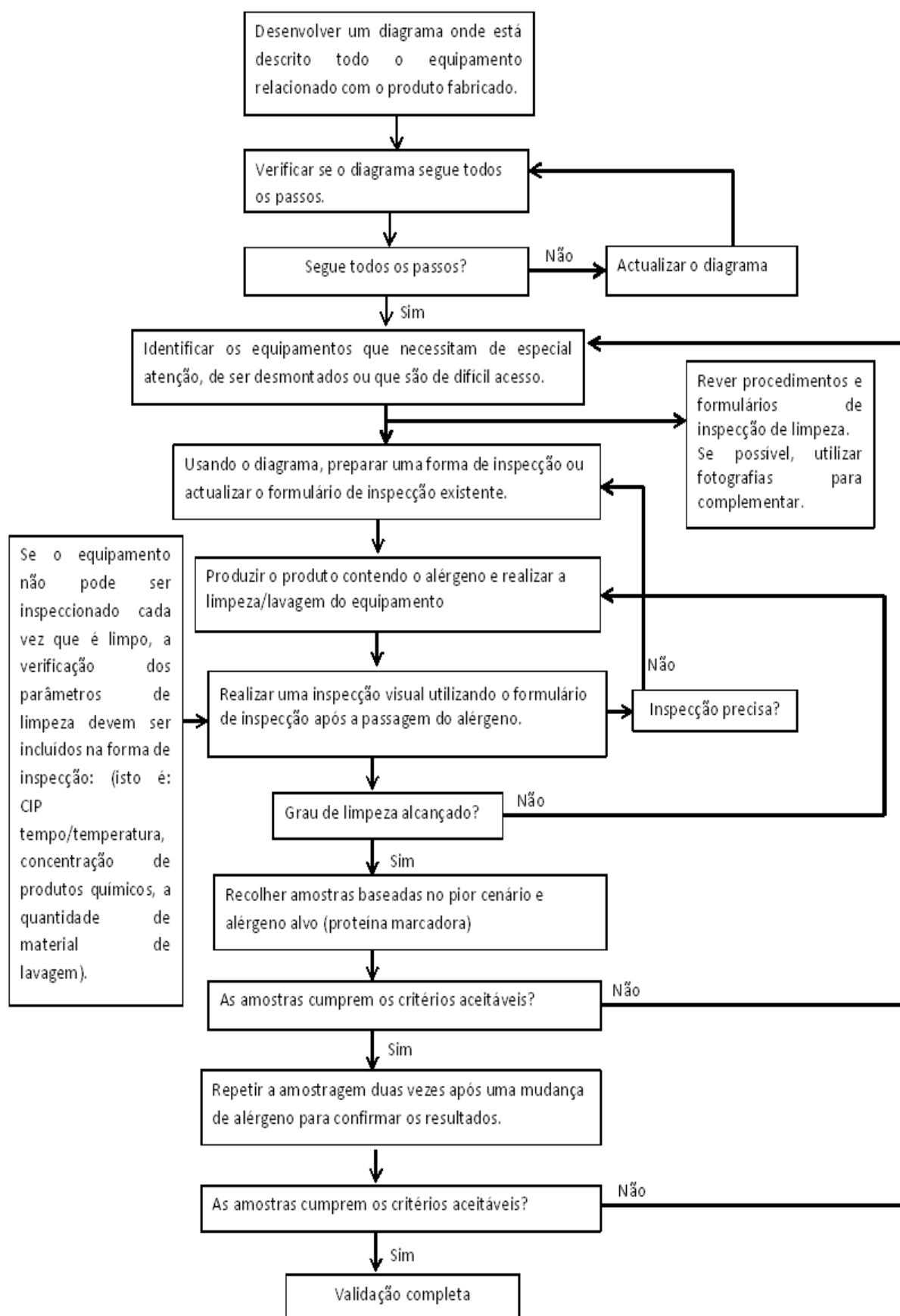


Figura 1.4: Representação do fluxograma de validação de resíduos do alérgeno, seguido na fábrica Refrige S.A.

A avaliação qualitativa do risco é recomendada como um ponto de partida, seguido por uma avaliação semi-quantitativa a fim de determinar se é ou não requerido ou aplicável um estudo de validação de base analítica. Por exemplo, poderá ser possível estimar os níveis de alérgeno na transição de um ciclo de produção para outro, isto é, medir a quantidade de material que é deixado para trás em um processo (por exemplo, com base na espessura do equipamento), que níveis de tais materiais seriam após diluição com o próximo produto (ou, no passo seguinte do processo), que quantidade de material é alérgeno e, por conseguinte, níveis de alérgeno no produto final que pode ser consumido.

A validação consiste tipicamente de uma inspeção visual (validação física) de superfícies de contato direto e indireto com alimentos e testes de análise quantitativa usando métodos adequados, tais como ELISA, e protocolos (validação analítica). Dispositivos de testes de fluxo lateral rápido podem ser utilizados para apoiar a verificação, mas não são ferramentas adequadas para validação.

Se um estudo analítico é exigido, os resultados analíticos precisos e robustos só são úteis se as amostras analisadas fizerem parte de um estudo corretamente concebido. Portanto, os procedimentos de amostragem e as análises subsequentes devem ser apropriadamente selecionados e implementados.

Para a condução da validação de uma linha de fabrico, o "pior" cenário deve ser escolhido, ou seja, a receita do mais difícil de limpar ou a receita com a concentração mais elevada do alérgeno, seguido de uma receita que não contém o alérgeno (proteína marcadora).

Quando não está disponível um *kit* de teste comercial para a validação analítica, e nenhuma outra proteína marcadora pode ser usada, as validações da linha de alérgenos devem seguir apenas o protocolo visual de inspeção e então cumprir o padrão visivelmente limpo.

Contaminação distribuída heterogeneamente (*i.e.*, leite em pó disperso) pode não ser suficientemente capturada por amostragem, dependendo do tamanho das partículas, e assim o ensaio analítico pode não fornecer dados confiáveis. Em tais casos, a inspeção visual e a confirmação de que a norma é visivelmente limpa é cumprida (sem resíduo de produto) deve ser considerada como o único critério de aprovação para um estudo de validação bem-sucedido.

Existem vários métodos para detetar as proteínas do leite (imunoquímicos, ou por eletroforese). Embora os métodos imunoquímicos sejam métodos relativamente rápidos, são bastante convenientes para o rastreio de rotina. Além disso, métodos imunoquímicos podem sofrer reações cruzadas com proteínas da matriz. Para uma identificação inequívoca de ingredientes alérgénicos, os métodos de confirmação são essenciais e usualmente requerem a utilização de técnicas associadas à espectrofotometria de massa (Monaci *et al*, 2008).

Assim, desta forma existe uma grande variedade de métodos disponíveis para determinar a ocorrência e os teores de ingredientes alérgeno nos produtos alimentares. Alguns dos métodos mais comuns não têm como alvo a proteína específica do alérgeno, mas sim um marcador indicativo para a presença dos alimentos (*i.e.*, traço da matéria-prima). Métodos baseados nos ácidos nucleicos (*i.e.*, DNA) consistem na amplificação de fragmentos específicos desta molécula por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para o alimento alérgico. Embora a deteção de marcadores de DNA seja benéfica têm de ter um alvo bem definido. Acresce ainda que o uso combinado da análise de dados e a especificidade experimental deve diminuir a

possibilidade de obtenção de falso-positivos. Deve ainda sublinhar-se que a alergenicidade de um alimento é causada pelas suas proteínas e não por respectivo DNA, portanto, a presença deste ácido num produto alimentar não garante a presença de alérgeno e vice-versa (Abbott *et al.*, 2010). Diferentes espécies, do género alimentício podem ter ainda diferentes perfis proteicos. Os métodos de processamento também podem afetar drasticamente o teor de proteína, a conformação, a solubilidade e a reatividade. Alérgenos alimentares podem estar presentes em muitas formas diferentes, transformadas ou não, dependendo da matriz alimentar em que se encontra, e com características muito divergentes e funções de um alimento. Embora improvável um único material pode apresentar simultaneamente muitas possibilidades diferentes. No entanto, um material de referência amplamente disponível poderá fornecer um ponto de referência comum para comparação de dados entre kits projetados para o mesmo alérgeno alimentar (Abbott *et al.*, 2010).

1.4 Alergia ao leite de vaca

O leite de vaca representa um ingrediente importante na dieta humana, graças à sua abundância em proteínas, péptidos, ácidos gordos e minerais (Monaci *et al.*, 2008). Este é um líquido constituído por vários nutrientes sintetizados na glândula mamária, a partir de precursores provenientes da alimentação e do metabolismo. Os componentes incluem a água, glícidos (basicamente lactose), gordura, proteína (principalmente caseína e albumina), minerais e vitaminas. O leite é segregado como uma mistura desses componentes e as suas propriedades são mais complexas que a soma dos seus componentes individuais. A proporção de cada componente no leite está influenciada, em diferentes graus, pela nutrição da vaca. Assim, a alimentação é responsável por aproximadamente 50% das variações de gordura e proteínas do leite, porém praticamente não afeta o conteúdo de lactose (Fredeen, 1996).

A concentração da proteína no leite de vaca varia entre 3,0 - 4,0 %, porém pode oscilar em função da raça da vaca e com a proporção da quantidade de gordura no leite (Santos, 2010). Da proteína do leite fazem parte 2 grupos principais (figura 1.5): caseínas (80%) e proteínas do soro (20%). (Campos, 2002).

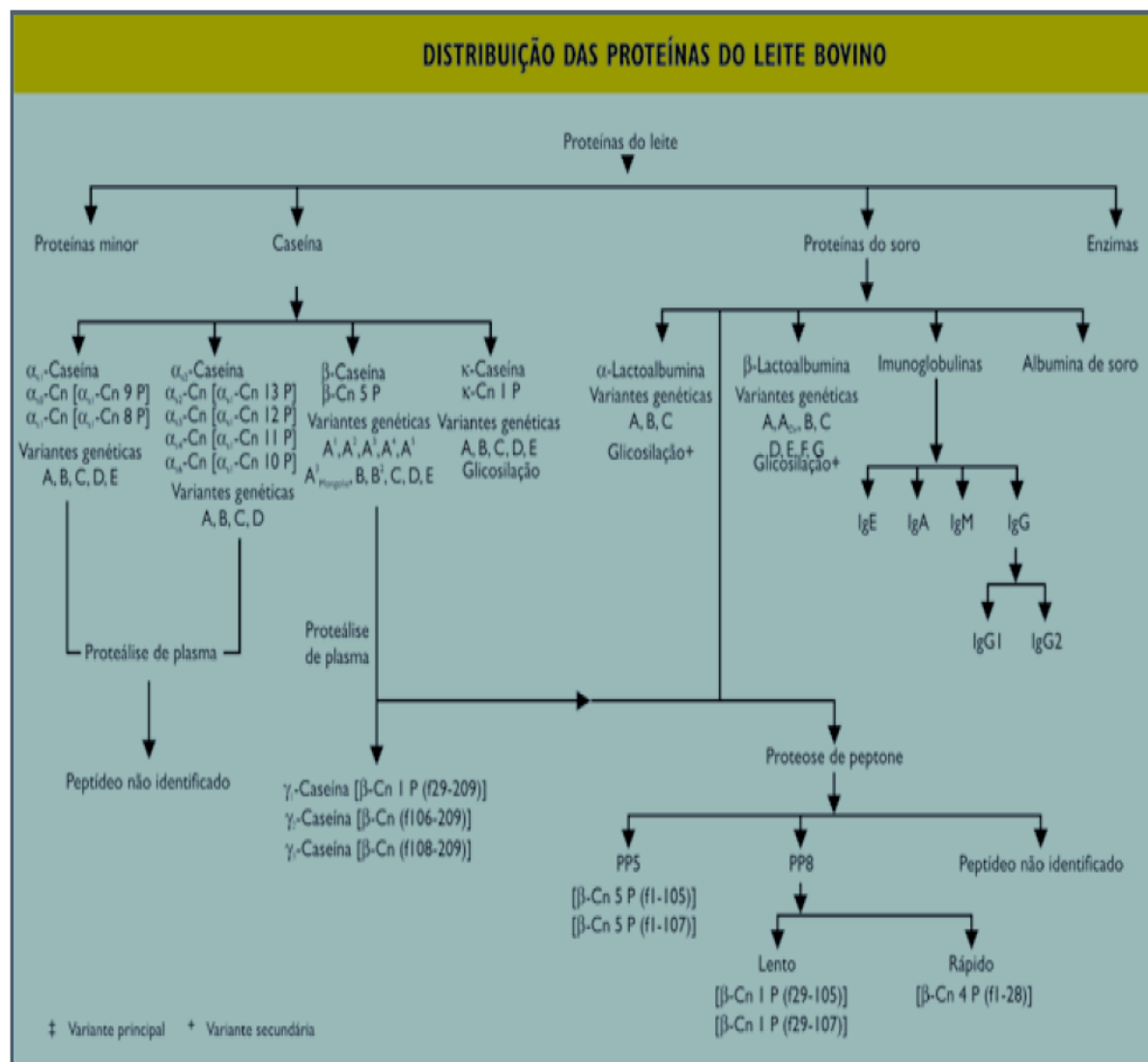


Figura 1.5: Distribuição das proteínas do leite de vaca (Clariant. Aditivos & Ingredientes, 2012).

Os alergénios presentes no leite de vaca parecem restringir-se a um certo número de famílias de proteínas que possuem, normalmente, funções biológicas associadas à hidrólise de proteínas e de polissacarídeos e à ligação, transporte e armazenamento de ligandos (Hoffmann-Sommergruber *et al.*, 2009).

As principais proteínas implicadas na resposta alérgica são as caseínas e as proteínas do soro (Crittenden *et al.*, 2005), sendo estas também os componentes proteicos maioritários do leite de vaca. No que se refere às proteínas do soro, os maiores alergénios são a β -lactoglobulina (b-Lg) e α -lactoalbumina (a-Lac) (Wal, 2002).

Segundo Wal (2002), num artigo de revisão sobre a estrutura e função da maioria das proteínas do leite de vaca identificadas como alergenias, não existe nenhuma relação definitiva que possa ser estabelecida entre a estrutura da proteína e a sua alergenicidade. No entanto, algumas características genéticas envolvendo a definição da sequência de aminoácidos, a estrutura secundária e a configuração tridimensional desempenham uma função relevante na alergenicidade (Wal, 2002).

A alergia ao leite é uma desordem complexa que envolve uma resposta imunológica anormal a uma ou mais proteínas do leite e mais de um mecanismo imunológico. A maioria das principais proteínas do leite bovino, incluindo caseína e soro do leite, está envolvida nas respostas alérgicas. Os mecanismos imunológicos que fundamentam a alergia ao leite incluem alergia mediada pela imunoglobulina IgE (hipersensibilidade imediata), que é a mais comum, e a alergia não mediada pela IgE (hipersensibilidade prolongada) (Wal, 2002).

Os motivos pelos quais alguns indivíduos desenvolvem alergia ao leite não são bem entendidas, mas acredita-se que estas envolvem uma complexa interação entre fatores genéticos e ambientais. O histórico familiar de alergia e a exposição precoce ao leite bovino são fatores de risco para a alergia a este alimento (Halken, 2004).

A alergia a proteínas do leite desenvolve-se em aproximadamente 2% dos bebés e crianças, sendo rara em adultos (0,1-0,5%). A prevalência de alergia ao leite bovino em crianças é frequentemente sobrestimada, particularmente pelos pais e na população em geral, se a condição é autodiagnosticada. O prognóstico em geral é bom, com 80 - 90% dos bebés afectados desenvolvendo naturalmente tolerância ao leite por volta dos cinco anos de idade (Heine *et al.*, 2002; Kleinman, 2004).

Allen *et al.* (2006) num estudo sobre alergias alimentares na infância, verificaram que a alergia às proteínas do leite de vaca afecta cerca de 2% dos lactentes com idade inferior a 2 anos nos países industrializados, sendo a forma mais comum de alergia alimentar nesta faixa etária, enquanto que Orsi *et al.* (2009), verificaram que esta prevalência oscila entre 2 e 7,5% .

Os sintomas relacionados com a alergia ao leite incluem, efeitos cutâneos, sintomas gastrointestinais, sintomas respiratórios e reacções anafiláticas com risco de vida. As reacções anafiláticas são extremamente raras. Em casos raros, pode ocorrer uma reacção sistémica grave, levando a uma queda súbita da pressão arterial, grave constrição das vias aéreas, uma reacção de choque generalizado e falência múltipla de órgãos. Este efeito é conhecido como choque anafilático e pode conduzir à morte em minutos, se não for tratada com rapidez. Apenas um pequeno número de pessoas com alergias alimentares estão em risco de tais reacções

graves, no entanto, existem muitos casos documentados de morte resultante da ingestão acidental de um alimento agressor. Na tabela 1.1 apresentam-se os sintomas da alergia às proteínas do leite de vaca.

Tabela 1.1: Sintomas na alergia às proteínas do leite de vaca (adaptado de: Brill, 2008 e Bahna, 2002).

Sintomas	Mediada por IgE	Não mediada por IgE
Cutâneos	Dermatite atópica Urticária Angioedema	Erupção cutânea de contacto Dermatite atópica
Gastrointestinais	Náuseas Vômitos Cólicas Diarreia Síndrome de alergia oral	Refluxo gastro-esofágico Enteropatia transitória Enteropatia com perda de proteínas Gastroenterite eosinofílica Colite Obstipação Crescimento inadequado Hemorragia
Respiratórios	Rinoconjuntivite Tosse Asma Edema da laringe Otite média com efusão	Hemosiderose pulmonar (síndrome de Heiners)
Outros	Anafilaxia	

O procedimento geral para diagnosticar a alergia ao leite envolve: o historial médico para verificar se os sintomas estão relacionados com a ingestão de leite; um exame físico para excluir outras causas das reações adversas; testes laboratoriais, para identificar a substância alérgica específica. Em crianças com mais de um ano de idade, um teste cutâneo de leitura imediata ou um teste RAST (teste rádio alérgeno absorvente) pode ser usado para ajudar a diagnosticar a alergia ao leite mediada pela IgE. Se o historial clínico, o exame físico e o teste alérgico apontam o leite como um potencial alérgeno, o diagnóstico é confirmado por eliminação bem definida e subsequentes procedimentos de desafios orais (Host, 2008).

Os cuidados com a alergia ao leite já existentes e devem visar o alívio dos sintomas, sem comprometer o estado nutricional ou o crescimento. A restrição do consumo de produtos lácteos em crianças com alergia ao leite bovino pode levar a consequências, por falta de nutrientes, afetando o crescimento e a saúde. A eliminação do leite na dieta deve ser feita sob orientação de um médico e/ou nutricionista, enquanto se monitoriza cuidadosamente o crescimento e o desenvolvimento da criança (Kleinman, 2004).

Não existem medidas preventivas para este tipo de problemas. O que se deve fazer é mesmo evitar o consumo de leite e produtos derivados. Devem também evitar-se ingredientes alimentícios derivados do leite

bovino que contenham proteínas intactas ou parcialmente hidrolisadas, como a caseína, caseinatos, soro, concentrados de proteínas do soro, sólidos do leite, hidrolisados de caseína e hidrolisados do soro. (Crittenden *et al.*, 2005)

1.5 Legislação de alergenios alimentares

Para proteger os consumidores, em muitos países é obrigatório indicar a presença de certos alergenios alimentares. Todas as substâncias ou produtos (também alimentos pré-embalados) que provocam alergias devem ser indicados na rotulagem. Cada ingrediente, ou auxiliar de processamento, proveniente de uma substância ou produtos que provocam alergias ou intolerâncias devem:

- Ser indicados na lista de ingredientes, com referência para o nome da substância ou do produto;
- Salientar através de uma tipografia que o distingue a partir do resto da lista de ingredientes.

Se nenhuma lista de ingredientes é fornecida, a substância ou produtos que provocam alergias ou intolerâncias deve(m) ser indicado(s) por meio de "contém + [substância (s) / produto (s)]".

Quando o nome do alimento se refere claramente às substância ou produtos que provocam alergias ou intolerâncias, não é necessário ter na sua rotulagem as substâncias em causa no produto.

- A Comissão Europeia tem de sistematicamente reexaminar e, se necessário, atualizar a lista de substâncias ou produtos que provocam alergias ou intolerâncias.
- A Comissão Europeia deve estabelecer medidas de execução relativas a rotulagem voluntária adicional "Pode conter".

Até ao momento, existem catorze alergenios alimentares (estes estão descritos no Regulamento (UE) 1169/2011) incluídos na directiva 2007/68/EC. O Regulamento (UE) 1169/2011 na prestação de informações aos consumidores muda consideravelmente a legislação em vigor sobre rotulagem de alimentos, incluindo as informações e requisitos dos alergenios. As novas regras entrarão em vigor em 13 de dezembro de 2014. O regulamento define requisitos em matéria de alergenio, como menções obrigatórias, a rotulagem de determinadas substâncias ou produtos que provocam alergias e intolerâncias, a informação voluntária adicional e rotulagem dos alergenios de alimentos não pré-embalados.

Assim este Regulamento (UE) 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de Outubro de 2011, sobre a prestação de informações aos consumidores, que altera os Regulamentos (CE) 1924/2006 e (CE) 1925/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho e que revoga a Directiva da Comissão 87/250/CEE, a Directiva 90/496/CEE do Conselho, a Directiva 1999/10/CE da Comissão, a Directiva 2000/13/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, 2002/67/CE e 2008/5/CE e do Regulamento (CE) 608/2004 da Comissão.

Estabelece os princípios, os requisitos e as responsabilidades gerais que regem a informação sobre os géneros alimentícios e, em particular, a rotulagem dos mesmos. Estabelece igualmente meios para garantir o direito dos consumidores à informação e procedimentos para a prestação de informações sobre os géneros alimentícios, tendo em conta a necessidade de proporcionar flexibilidade suficiente para dar resposta a evoluções futuras e a novas exigências de informação. Este Regulamento reúne e actualiza num só texto a informação da Directiva 2003/89/CE relativa à rotulagem dos géneros alimentícios (transposta pelo Decreto-

Lei n.º 560/99 e alterações) e da Directiva 90/496/CEE relativa à rotulagem nutricional (transposta pelo Decreto-Lei n.º 167/2004 e alteração). Este Regulamento reporta para os ingredientes presentes nos géneros alimentícios, uma vez que exige aos fabricantes a indicação da presença de catorze grupos de possíveis alérgenos, se forem utilizados como ingredientes em alimentos pré-embalados, tais como as bebidas alcoólicas, independentemente das quantidades em que são utilizados. Estes alérgenos envolvem os cereais, que contêm glúten, peixe, marisco, ovos, amendoim, soja, leite e seus derivados, incluindo lactose, frutos secos, aipo, mostarda, sementes de sésamo e os sulfitos. Estes alérgenos são responsáveis por 90% das reacções alérgicas.

A Directiva 2003/89/CE sobre rotulagem de alimentos foi totalmente implementada até o final de 2005 na legislação nacional. Este regulamento reforça a regra geral de que todas as substâncias que foram introduzidas intencionalmente num género alimentício devem ser indicadas com o nome específico na lista de ingredientes. Deste modo, a "regra de 25%" (o que não foi afectado pela última Directiva 2000/13/CE) que permite “o não obrigatório de rotulagem dos componentes” (os ingredientes compostos em que existem menos de 25% do produto final) é definitivamente abolida (Monaci *et al.*, 2005).

Ambas as directivas visam fornecer informações mais completas aos consumidores com alergias, permitindo-lhes identificar os ingredientes e alimentos que são alérgenos. Para este efeito, a legislação irá introduzir uma rotulagem obrigatória de todos os produtos alimentares que contêm ingredientes que são considerados os mais comuns alérgenos alimentares. O leite é um dos catorze ingredientes alérgenos cuja presença tem de ser declarada no rótulo de produtos alimentares.

1.6 Coca-Cola

Para caracterizar a empresa Refrige, é necessário contar um pouco da história da Coca-Cola, que esteve na base da sua criação.

Em 1886 que, na cidade de Atlanta (EUA), um farmacêutico chamado John S. Pemberton (figura 1.6) descobriu a fórmula de uma nova bebida refrigerante à base de extratos vegetais. Nesse ano, existiam bebidas refrigerantes de frutas. Porém, nenhuma feita com extratos vegetais, sendo isso uma novidade (Manual de Acolhimento da Refrige, 2010).



Figura 1.6: John S. Pemberton.
(Manual de Acolhimento da Refrige, 2010)

O contabilista da farmácia, Frank Robinson, deu a ideia da marca – Coca-Cola e desenhou o logótipo e grafismo característico que ainda hoje se mantém. Deste modo, a farmácia de Jacob, na Rua Peachtree, em Atlanta, passa a ser a primeira sede da Coca-Cola. Nessa época o produto não era mais do que um xarope a que se juntava água gaseificada no instante em que era servido.

Cinco anos mais tarde, o seu criador cedeu os direitos de exploração da Coca-Cola a outro farmacêutico da cidade chamado Asa Candler. É este quem regista a Coca-Cola como marca comercial nos EUA e quem dá um novo impulso ao negócio, ampliando a comercialização do produto e os meios publicitários. Em quatro anos, consegue que a Coca-Cola se consuma um pouco por todos os EUA (Manual de Acolhimento da Refrige, 2010).

Consta que durante um jogo de baseball, em 1899, a que Candler assistia com dois jovens advogados - Benjamin Thomas e Joseph Whitead – estes lhe propuseram engarrafar a bebida em larga escala. Para Candler, a ideia parecia tonta. Era-lhe difícil imaginar que a sua bebida, vendida até então copo a copo em fontes de soda, pudesse ser vendida numa garrafa. No entanto, e apesar de inicialmente não ver viabilidade na ideia, Candler acabou por se deixar convencer e cedeu a estes dois jovens os direitos exclusivos de engarrafamento nos Estados Unidos. A primeira fábrica engarrafadora começou a funcionar em Chattanooga e a segunda, um pouco mais tarde, em Atlanta (Manual de Acolhimento da Refrige, 2010).

No final do século XIX, Whitead e Thomas entenderam que quem estava em melhores condições de fabricar, vender e distribuir Coca-Cola eram as empresas locais com capacidade e talento para se tornarem engarrafadores de Coca-Cola (Manual de Acolhimento, 2010). Assim, com o negócio a aumentar, ambos criaram um sistema que se iria converter no protótipo de toda a indústria de bebidas refrigerantes e de outras no Sistema de Engarrafadores. Este sistema autorizava as empresas locais a fabricar, distribuir e vender o produto cujo preparado básico é fornecido pela *The Coca-Cola Company* (Manual de Acolhimento da Refrige, 2010). As inovações seguem-se. Com o slogan “*A sede não conhece estações*”, a Coca-Cola deixa

de ser um produto sazonal para se tornar um produto consumido durante todo o ano (Manual de Acolhimento da Refrige, 2010).

The Coca-Cola Export Corporation é instituída em 1931, pretendendo expandir o Sistema de Engarrafadores para o resto do mundo. Em 1974 a Coca-Cola já estava presente em quase todos os países do mundo. Em Portugal, no entanto, a implementação do negócio foi sucessivamente vetada até ao ano de 1977, altura em que se constituiu a Refrige, enquanto engarrafador Português (Manual de Acolhimento da Refrige, 2010). Actualmente a, *The Coca-Cola-Company*, com sede em Atlanta nos EUA, é líder no mercado das bebidas refrigerantes, produz quase 50 marcas de bebidas com e sem gás e opera em cerca de 200 países (Manual de Acolhimento da Refrige, 2010). Assim, quando se fala no Sistema Coca-Cola, falamos da relação entre a Companhia Coca-Cola (*TCCC – The Coca-Cola Company*) e o Engarrafador para um determinado território delimitado.

1.6.1 Refrige S.A

O primeiro slogan comercial produzido para a Coca-Cola em Portugal foi a frase de Fernando Pessoa “*Primeiro estranha-se, depois entranha-se*”.

Após, varias negociações entre o empresário Sérgio Geraldês Barba e o Príncipe Makinsky, na tentativa de levar o negócio da Coca-Cola para Portugal, que posteriormente, também envolveram o Presidente da Companhia Coca-Cola de Espanha, D. Juan Manuel Sainz de Vicuña, começaram a desenhar as bases para a constituição da Refrige – Sociedade Industrial de Refrigerantes S.A., a concessionária da Coca-Cola para Portugal (Manual de Acolhimento da Refrige, 2010). Assim, a Refrige é instituída a 03 de Março de 1977, e a 04 de Julho é vendida a 1ª Coca-Cola fabricada em Portugal. Porém, em 1977, ainda sem fábrica própria, a empresa produzia a partir da Unidade Fabril da Fruto Real, localizada em Alfragide, possuindo apenas uma linha de enchimento, a Coca-Cola 20cL. Passado um ano, a produção mudou-se para a fábrica de Azeitão, onde ainda permanece actualmente (Manual de Acolhimento, 2010).

Em 1985, em Estarreja, foram adquiridas instalações fabris suplementares, que laboraram até ao final de 1994, altura em que foram desativadas, face ao grande investimento que se realizou na fábrica atual de Azeitão, onde aumentou substancialmente a sua capacidade produtiva (Manual de Acolhimento da Refrige, 2010).

Em 1997 a empresa espanhola LUSOBEGA, S.L. comprou 94,65% das ações da Refrige S.A, passando a ser o seu maior acionista. No entanto, Sérgio Geraldês Barba, fundador da Refrige S.A, manteve-se como Presidente do Conselho de Administração até à sua morte, em 2006 (Manual de Acolhimento da Refrige, 2010).

Hoje em dia, a Refrige produz e distribui unicamente produtos da Companhia Coca-Cola. Se em 1977, a empresa só produzia Coca-Cola, atualmente oferece uma gama muito diversificada que inclui refrigerantes, bebidas energéticas, bebidas ativas, nestees e sumos (figura 1.7), com uma vasta gama de sabores.



Figura 1.7: Representação de algumas bebidas fabricadas na Refrige S.A.

A Refrige S.A é uma empresa autónoma em termos de capital e de gestão que detém a estrutura industrial, comercial e de distribuição, responsável por fazer chegar os produtos ao mercado, dentro dos mais elevados padrões de segurança, qualidade e serviço. Esta tem cerca de 450 colaboradores, é atualmente, um dos engarrafadores mais modernos da Europa e líder no mercado das bebidas refrigerantes em Portugal.

Considerando a Divisão Ibérica da Coca-Cola, composta por Portugal e Espanha, esta torna-se numa das mais importantes do sistema internacional, ocupando o 3.º lugar no volume de vendas na Europa, e o 7º no mundo (Manual de Acolhimento da Refrige, 2010).

1.7 Caracterização do produto *Minute Maid*

Em 2008, o leque de escolha dos portugueses aumentou de forma acentuada com a chegada da marca nº1 do mundo em sumos, *Minute Maid*. A marca apresenta 9 sabores de frutas diferentes (*Limão, Laranja, Pêra-Ananás, Maçã-Uva-Kiwi, Manga-Maracujá, Pêssego, Ananás, Duofrutas Mediterrâneo e Duofrutas Tropical*)

No âmbito deste estudo os sumos produzidos são chamados *Minute Maid Duofrutas Tropical* e *Minute Maid Duofrutas Mediterrâneo*, e resulta de uma mistura de frutas e leite magro (figura 1.8). Estes têm na sua composição, leite em pó, água, açúcar, sumo de frutos, estabilizador pectina, regulador de acidez, aromas, antioxidante, corante de β -caroteno e vitamina E.



Figura 1.8: *Minute Maid duofrutas Tropical e Mediterrâneo*. (www.refrige.pt).

1.8 Identificação e caracterização do alérgeno

Neste trabalho, para o fabrico deste produto, e como foi referido anteriormente o leite em pó magro é adicionado, para formular a bebida. Sendo então neste caso, as proteínas existentes no leite em pó o potencial alérgeno.

O leite em pó adicionado está na bebida em 10% como leite magro, ou seja este é caracterizado por estar na bebida em 10% como leite magro.

O estudo deste alérgeno é prejudicado porque na prática, muitas vezes, os investigadores dividem-se em incrédulos, que subestimam sintomas, ou aqueles que os hiperestimam, levando as pessoas ao uso de dietas e privações desnecessárias, com graves consequências nutricionais e psicológicas. Neste contexto, há necessidade de uma constante revisão sobre este assunto, tentando informar as pessoas alérgicas, através dos quadros clínicos e métodos diagnósticos, simplificando e direcionando o seu diagnóstico. (Junior, 2001) Deste modo, é muito importante para as fábricas que produzem produtos com leite e outros tipos de produtos sem leite, a terem muito cuidado com as várias contaminações que podem existir entre os vários produtos.

Neste contexto, a proteína do leite, enquanto alérgeno, apesar das elevadas propriedades nutricionais e funcionais, também representa uma grave ameaça para a saúde dos consumidores alérgicos ao leite. Aponte-se que refrigerantes e sumos frescos podem conter leite, e este não estar declarado na embalagem, constituindo, portanto, um risco não declarado para a saúde dos indivíduos que são alérgicos às proteínas do leite (Monaci *et al*, 2008).

1.9 Controlos, necessários para a gestão eficaz deste alérgeno na fábrica

A indústria alimentar tem realizado esforços significativos na implementação de práticas de gestão de risco de alérgenos. Para além da redução da exposição involuntária da alergia dos consumidores aos alérgenos, esta também levou à propagação de rotulagem consultiva. Isso pode reduzir as opções disponíveis para as pessoas alérgicas, resultando em frustração e comportamento de risco, que nega a sua finalidade. A rotulagem sobre a possível contaminação cruzada com alérgeno é justificável apenas com base numa análise de risco aplicado a uma operação de gestão responsável.

A fim de gerir a sua condição, os consumidores com alergias alimentares e intolerâncias alimentares devem ser plenamente informados sobre a natureza e a composição dos alimentos que estão a comprar. Mudanças na legislação da rotulagem dos alimentos levaram às melhorias significativas na rotulagem de ingredientes alérgicos nos alimentos. No entanto, os componentes alérgicos indesejados podem estar presentes em alimentos, como resultado de fabrico e outras operações. Alimentos alérgicos possuem algumas características únicas, como um perigo para a segurança alimentar, que precisam ser considerados na avaliação e gestão do risco, tal como, alimentos alérgicos são inofensivos para a maioria dos consumidores. Os consumidores intolerantes ou alérgicos a diferentes géneros alimentícios podem reagir a uma vasta gama de quantidades de alimentos alérgicos. Estas quantidades podem variar consideravelmente (de microgramas a gramas) dependendo da tolerância individual do indivíduo, a sua saúde e da sua medicação corrente. Alguns consumidores podem reagir de forma aguda sensíveis a níveis muito baixos (baixa microgramas), ainda que levemente. Apesar de muito trabalho tem sido feito para determinar os limiares / não níveis de efeitos adversos e usá-los na avaliação de risco de segurança alimentar, ainda não foi possível interpretar esta informação em termos de saúde pública, de acordo entre as partes interessadas (Pérez, 2013)

As empresas alimentares têm a responsabilidade de estabelecer um sistema de gestão de segurança alimentar para cumprir com os requisitos legais. A gestão de alérgenos deve fazer parte integrante das estratégias de garantia de segurança alimentar e deve considerar-se o risco do alérgeno alimentar, a par de outros riscos de segurança alimentar.

Empresas do sector alimentar devem operar de acordo com os princípios de Boas Práticas de Fabrico (BPF). Isso requer um compromisso de assegurar que os produtos cumprem os requisitos de segurança, qualidade e legalidade dos alimentos. A adesão aos controlos existentes BPF será essencial para a gestão do alérgeno, por exemplo, evitar a contaminação cruzada pela segregação usando utensílios de limpeza adequados só para aquele efeito.

A gestão de riscos inicia com a avaliação do risco, o que, para os alérgenos, exige a consideração de, pelo menos, a probabilidade de que eles estão presentes, a sua forma física (pó, líquido, em pedaços, etc), bem como a quantidade de qualquer alérgeno presente. A gestão de

riscos deve abranger todos os componentes da cadeia de abastecimento, a partir de especificações de fornecimento de matérias-primas para a venda do produto acabado, incluindo o *design* de produto e desenvolvimento.

Esta avaliação deve ser realizada por pessoal devidamente treinado em gestão dos alérgenos. Procedimentos documentados para o controle e prevenção da contaminação devem estar no local e visível ou facilmente disponíveis a todos os funcionários da área de trabalho. Os procedimentos devem conter informações sobre:

- Diretrizes de desenvolvimento de produtos, em termos de alérgeno;
- Uma boa higiene, *i.e.*, regras sobre a roupa, lavar as mãos e o contato da mão com os alimentos;
- Limpeza das instalações, equipamentos e ferramentas;
- Manuseio de materiais de trabalho, *i.e.*, as condições em que podem ser utilizados tais produtos;
- Gestões de resíduos, *i.e.*, como os resíduos devem ser rotulados e mantidos separados do retrabalho;
- Situações em que o potencial de contaminação cruzada pode ocorrer entre matérias-primas, produtos, linhas de produção ou equipamentos é responsabilidade de cada empregado para prevenirem isso;
- Programação da produção;
- Rotulagem de matérias-primas, produtos semi-acabados e produtos acabados.

Os alérgenos alimentares são comumente adicionados como ingrediente único ou incluídos como parte de um ingrediente pré-misturado. Neste caso, a Refrige S.A é uma entidade que está ciente da presença de um alérgeno no sumo a ser produzido, onde este pode ser identificado na lista de ingredientes da embalagem. Porém, as contaminações cruzadas de sumos sem alérgeno e com alérgeno, tem de ser evitada. Isso pode ocorrer, por exemplo, quando suprimentos com e sem os alérgeno ficam próximos durante o armazenamento de ingredientes. Além disso, durante a produção de alimentos em si, existem vários processos que possibilitam a transferência de traços de um alérgeno para outros produtos, por exemplo ao compartilhar equipamentos para misturar ou pesar ingredientes, ou usar linhas de produção ou equipamentos sem uma limpeza adequada. A limpeza inadequada também pode causar transferência, transmitindo alérgeno pelos enxaguamentos ou procedimentos de limpeza. Até mesmo o pessoal da produção pode contaminar os alimentos através de roupas contaminadas. Isso pode acontecer em qualquer estágio da produção em que subsistir reaproveitamento de materiais de processo ou produtos acabados para minimizar o desperdício. É preciso muito cuidado com essas práticas, para assegurar a separação e reutilização correta desses materiais.

Desta forma, a segurança alimentar não pode ser assegurada através de testes do produto final por si só. Deve ser construída sobre uma análise de riscos em cada etapa da cadeia de abastecimento e do processo. A gestão da segurança alimentar eficaz requer um adequado comprometimento de recursos e de comunicação entre todos os indivíduos que estão integradas na cadeia de fabrico deste produto. Desta forma, a gestão eficaz do risco de alergenios alimentares requerem uma análise cuidadosa da presença dos alergenios, tanto uma análise intencional da receita, e não intencional através da análise da contaminação cruzada entre todas as fases de produção dos alimentos no fabrico até ao produto final. A avaliação de risco HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Point*) do alergenio ajudará a identificar onde ocorrem os perigos do alergenio e se os sistemas existentes podem gerir o risco potencial em condições normais de operação e de boas práticas de produção. Essa análise de risco deve ser realizada por especialistas devidamente treinados, como os membros da equipas HACCP, como parte integrante do sistema de qualidade e segurança alimentar do fabricante.

Os géneros alimentares alérgicos, e seus derivados, que devem ser tomados em consideração, são aqueles que tenham sido identificados como de importância primordial para a saúde pública e requerem rotulagem obrigatória, conforme descrito na legislação da UE. A mesma abordagem pode ser utilizada genericamente para outros alimentos alérgicos.

Assim, a gestão do alergenio deve ser integrada num programa global de gestão da segurança alimentar desde o programa de HACCP tratamento das reclamações e em formações sucessivas.

Em alguns casos, o controlo de alergenio poderia entrar em conflito com os controlos necessários para outros riscos de segurança alimentar, o que reforça a necessidade de considerar todo o sistema de produção. Por exemplo, a limpeza húmida das linhas é eficaz para o controle de alergenio, mas pode causar problemas microbiológicos, caso a água não seja devidamente removida.

A equipa de HACCP certifica-se, da análise de perigos considerados em todas as etapas ou áreas onde os alergenios estão presentes ou onde o contato cruzado (contaminação cruzada) pode ocorrer, de modo que os controlos possam ser identificados e aplicados em conformidade. Porque a contaminação cruzada entre os processos / áreas precisam de ser considerados, pois, podem ser úteis para destacar em mapas de processos, nas áreas onde os alergenios são adicionados (ou podem estar presentes). Na tabela 1.2 apresentam-se, de forma simplificada, com os pontos de controlo que foram adicionadas ao plano de HACCP.

Tabela 1.2: Representação simplificada, dos perigos e das medidas de controlo que foram adicionadas ao plano de HACCP (adaptada do manual de HACCP da Refrige, 2010).

Fase do Processo	Tipo de Perigo			Medidas de controlo
	Biológico	Químico	Físico	
Receção dos Concentrados	Não	Presença de resíduos de leite em embalagens de outras partes de concentrado	Não	Programa de pré-requisitos: Controlo de fornecedores (Exclusivamente Coca-Cola)
Receção de ingredientes à temperatura ambiente	Não	Presença de resíduos de leite em embalagens de outras partes de concentrado	Não	Programas de Pré-requisitos: Boas práticas dos fornecedores no transporte Cumprimento de especificações Boas práticas na receção Inspeção primária à receção
Mistura manual dos ingredientes na sala de xaropes	Não	Alimentos com propriedades alergénicas (segundo <i>Codex Alimentarius</i>)	Não	Programa de pré-requisitos: Boas Práticas de fabrico
CIP - Limpeza e Desinfecção	Não	Resíduos de leite após fabricos de MM Duofrutas	Não	Programa de pré-requisitos: Cumprimento do programa CIP e limpeza da área Análise de resíduos de leite (fase de validação)
Armazenamento	Não	Presença de resíduos de leite por quebra de MM Duofrutas	Não	Programas de Pré-requisitos: Boas práticas de armazenagem e distribuição

Expedição	Não	Presença de resíduos de leite por quebra de MM Duofrutas	Não	Programas de Pré-requisitos: Boas práticas de armazenagem e distribuição
Distribuição	Não	Presença de resíduos de leite por quebra de MM Duofrutas	Não	Programas de Pré-requisitos: Boas práticas de armazenagem e distribuição

Dado o efeito adverso, a saúde (em consumidores alérgicos), é classificada de grave, podendo ser susceptível de ser alta, mas a probabilidade de haver este contacto cruzado dependerá de cada situação em particular.

Assim deste modo, serão descritos todos os controlos, realizados para a gestão eficaz do alérgeno, desde os fornecedores e fabrico da bebida até ao armazenamento do produto final. O fluxograma simplificado do enchimento do sumo com leite está representado na figura 1.9, neste encontram-se umas bolas com uns números que se refere aos sítios que requerem mais atenção nas boas práticas. Onde a seguir serão descritas todas as boas práticas nesses sítios específicos.

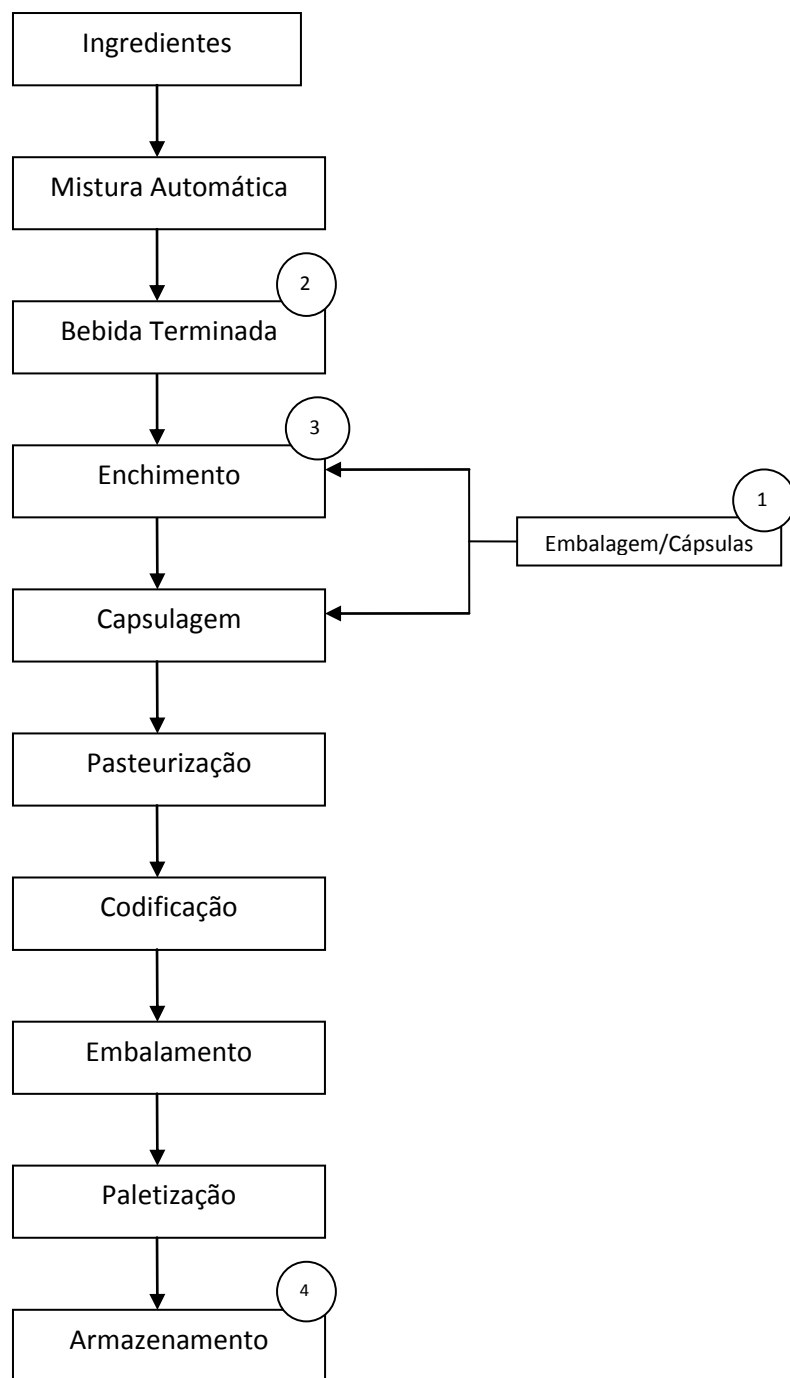


Figura 1.9: Representação do fluxograma de enchimento (resumido) do sumo Duofrutas.

Na receção das matérias-primas é necessário ter uma série de cuidados, desde os fornecedores, do projeto de engenharia e manutenção dos equipamentos e do controlo de qualidade. A seguir estão descritos todos os cuidados a ter em atenção nos itens referidos em cima.

1.9.1 Fornecedores

Todos os fornecedores das matérias-primas foram convidados para uma formação completa e actualizada do alérgeno em causa (para cada local de abastecimento e para cada ingrediente). A explicação do ingrediente alérgeno fornecido foi prestada a todos os fornecedores, uma vez que, as informações do alérgeno estão por completo nos ingredientes da embalagem do produto em causa.

Assim, as informações do alérgeno foram consideradas parte da "especificação", do ingrediente do sumo. Todos os fornecedores existentes foram avisados (como parte do processo de recolha de dados) que terão de informar sobre quaisquer mudanças. Desta forma, as auditorias aos fornecedores continuaram a ser um mecanismo de verificação chave para garantir se o processo de mudança é eficaz nas futuras embalagens do produto.

1.9.2 Projeto de engenharia e manutenção

Para a produção deste sumo teve de se garantir que todos os equipamentos seriam fáceis de limpar, inspecionar (se necessário, desmontar para averiguar se está limpo). Para os equipamentos a serem utilizados também se deve evitar o contacto com outras linhas, de modo a não haver contaminações cruzadas entre as linhas de enchimento. Desta forma, avaliou-se a necessidade de afastamento das linhas adjacentes com o intuito de proteger das barreiras físicas. Também se assegurou que todas as operações de manutenção não permitam a contaminação cruzada. Manteve-se os equipamentos de forma a assegurar que os sistemas estão a operar como definido. Estabeleceram-se fluxos contínuos para matérias-primas, materiais de embalagem, colaboradores, por forma a minimizar as contaminações cruzadas.

1.9.3 Controlo de qualidade da matéria-prima

Ao receber as matérias-primas, devem-se rever e inspecionar as matérias-primas rececionadas quanto há informação associada a alérgeno. As matérias-primas que contêm alérgeno devem ser facilmente identificáveis com etiquetas, código de cores, símbolos e ícones.

Cada operador que recebe as embalagens com alérgeno, deve assegurar que cada embalagem rececionada, é adequadamente identificada. Além disso, devem existir procedimentos para manuseamento de embalagens danificadas para evitar contaminação cruzada.

2

O fabrico da bebida é realizado na Sala de Xaropes, sendo necessário uma série de cuidados no armazenamento dos concentrados, que estão descritos a seguir.

1.9.4 Armazenagem dos concentrados

Foi dada formação aos operadores das matérias-primas, de modo a serem separadas todas as matérias-primas com alérgeno das restantes por forma a evitar contaminação cruzada. Esta separação foi realizada: utilizando linhas no pavimento; com atribuição de uma cor específica a utilizar nas embalagens / depósitos limpos e fechados.

Foram definidas as áreas de armazenagem para cada tipo de alérgeno, por forma a considerar a sua natureza.

Os operadores da Sala de Xaropes devem assegurar, que as áreas para armazenagem de ingredientes alérgeno estão perfeitamente identificadas, como por exemplo, a utilização de uma marcação das áreas de armazenagem (figura 1.10), um instrumento de corte específico para a utilização na abertura do saco do concentrado do leite em pó (figura 1.11).



Figura 1.10: Representação da área de armazenagem dos sacos de leite em pó.

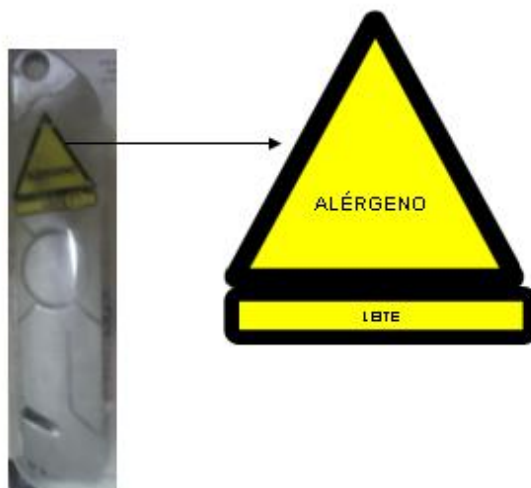


Figura 1.11: Representação do instrumento de corte específico para a utilização em matérias-primas alergénicas.

Deve evitar-se o armazenamento de ingredientes alergenicos em cima de ingredientes não alergenicos.

Se existir risco de acumulação do ingrediente alergeno, poderá haver necessidade de retirar as paletes, *i.e.*, pó dos sacos do leite em pó.

1.9.5 Manuseamento da matéria-prima

A identificação e a segregação dos materiais alergenicos devem ser mantidas em todas as etapas do processo de fabrico.

Nesta etapa deve ser dada particular atenção ao controlo da rotulagem e armazenagem de materiais que não são integralmente consumidos na produção.

Os resíduos de materiais que contiveram ingredientes alergenicos devem ser manuseados e depositados conforme o risco de contaminação cruzada, (*i.e.*, os sacos vazios do leite em pó, devem ser fechados no interior de bidons).

1.9.6 Controlo de pó e alergeno

Deve-se ter cuidado com o ingrediente seco (neste caso o leite em pó), pois este pode gerar pó durante a formulação e mistura. O pó pode conter uma carga de alergeno elevada mas a maioria das partículas deposita-se rapidamente e assim o pó não constitui, na maioria das vezes, uma fonte de contaminação cruzada grave, por si só. Contudo, na contaminação cruzada pelo operador deve-se ter em consideração:

- Os operadores que manuseiem ingredientes alérgenos, (leite em pó) devem utilizar aventais ou batas plásticas;
- A proteção utilizada deve ser retirada e as mãos lavadas após o manuseamento do ingrediente alérgeno antes de se, deslocar para outra área ou iniciar uma nova tarefa.

Deve-se procurar junto ao local de adição do leite em pó se existe acumulação deste nos equipamentos adjacentes, materiais (se próximos), e áreas por cima da zona de processo (*i.e.*, os suportes de lâmpadas)

Deve ser dada especial atenção à avaliação do risco de contaminação cruzada em áreas em que ocorra contato direto do produto e à proximidade imediata de todas as linhas de produção.

Também se deve remover todo e qualquer resíduo de pó visível após manuseio do ingrediente contendo alérgeno (como parte do processo de limpeza/higienização), sendo que os aspiradores podem ser usados para limpeza a seco. Deve-se em primeiro lugar dar formação aos operadores das linhas de produção sobre produtos alérgicos específicos.

3

1.9.7 Produção

A todas as pessoas que envolvem a produção deste sumo foram dadas formações, com o intuito de terem boas práticas de fabrico.

Se possível, deve-se programar o enchimento de produtos alérgenos da mesma natureza em conjunto. Sendo que a produção de produtos não alérgenos deve ser programada antes dos produtos com alérgenos.

Deve-se introduzir no processo os componentes alérgenos tão tarde quanto possível (para minimizar a quantidade de equipamento partilhado).

Os contentores que contenham materiais/produtos alérgenos durante o processo têm de estar claramente rotulados para facilitar a sua identificação (figura 1.12).



Figura 1.12: Exemplo de um contentor devidamente identificado.

Todas as ferramentas, utensílios e contentores para alérgeno devem ser identificados com código de cores e/ou símbolo.

Caso seja, reutilizado algum agente de processo, como por exemplo a água de enxaguamento de CIP (*Clean in Place*), deve-se assegurar que estão em vigor os controlos para prevenir o risco de contaminação cruzada por alérgeno. Também na produção tem de se assegurar que os fluxos de matérias-primas, materiais de embalagem e colaboradores são limitados durante o fabrico de produtos alérgenos para minimizar a contaminação cruzada.

4

1.9.8 Armazenamento do produto final

A presença de resíduos de alérgenos nas superfícies exteriores das embalagens ou superfícies por onde passa a bebida (garrafas) podem ainda representar um risco para os consumidores que sofram da alergia.

As exigências para as condições de armazenagem dependerão da análise dos riscos identificados mas, como regra geral, os produtos finais que contêm alérgenos não devem ser armazenados por cima dos produtos não alérgénicos e além disso os produtos finais com alérgenos, apenas não levam nenhuma sobreposição do mesmo produto, (Figura 1.13).



Figura 1.13: Colocação correta das paletes do produto em causa.

2. Objetivos

Neste trabalho pretende-se efectuar uma diferenciação entre alergias e intolerâncias alimentares, considerando-se a acção do leite como alergeno. Também neste estudo se pretende efectuar uma análise em torno dos cuidados a ter ao longo do enchimento de um sumo com leite, desde a chegada das matérias-primas ao seu armazenamento como produto final. Considera-se neste caso a implementação de boas práticas de fabrico aquando o enchimento de um sumo com leite e também dos cuidados a ter nas linhas de produção com esse alergeno. Finalmente, como resultado pretende-se uma validação com um *kit* de alergeno após higienização dos equipamentos e enchimento do produto com leite, para aferição da existência ou não de resíduos de leite.

3. Metodologia para controlo de alérgeno

A implementação de um sistema de controlo de alérgeno é de grande importância para que os fabricantes de alimentos aumentem a confiança na segurança de seus produtos e reduzam o risco de recolha de produtos, assim como o prejuízo à marca associado.

Técnicas analíticas utilizadas para detectar a presença ou ausência de resíduos ou contaminação cruzada de substâncias alérgicas ou intolerantes podem variar. Um padrão de "visualmente é fisicamente limpo" constitui a base de partida para a gestão de alérgeno e pode fornecer uma boa base para uma operação segura uma vez que tenha sido validado e verificado periodicamente. A ausência de um alérgeno acima de um específico limite de detecção num equipamento visualmente limpo, pode ser usado como base para a avaliação limitada quantitativa dos riscos, isto se a amostragem for representativa.

Os métodos e técnicas mencionadas podem também ajudar na confirmação da composição do material.

A metodologia utilizada vai fornecer orientação sobre como validar práticas de mudança (limpeza, lavagem), onde alérgenos e produtos não alérgenos são produzidos em equipamento comum de fabricação de alimentos e a determinação quantitativa do nível de contaminação de modo a avaliar e, se necessário, reduzir o risco resultante.

Esta metodologia tem como objetivo o controlo de resíduos de proteínas do leite em todo o processo produtivo, desde a receção de concentrados até ao armazenamento de produto final.

Para este estudo foi utilizado um *kit* de alérgenos, designado *Reveal for Total Milk*. Este *kit*, tem por base as técnicas do método de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) onde se detetam os marcadores proteicos específicos em matrizes.

A detecção de alérgenos alimentares por o método de ELISA é um procedimento analítico único, caracterizado pelo reconhecimento e ligação de antígenos específicos a anticorpos (Abbott et al., 2010). Como existem muitas regulamentações em vigor sobre identificação de alérgeno, subsiste uma necessidade por métodos de detecção apropriados. Existem várias tecnologias disponíveis, como os testes baseados em anticorpos específicos, por exemplo ensaios imunoenzimáticos ou ensaios de fluxo lateral, métodos de reação em cadeia de polimerase e novos conceitos como espectrometria de massa, com graus variados de comercialização, fornecendo resultados qualitativos e quantitativos. No entanto, as técnicas cromatográficas têm o inconveniente de serem dispendiosas, trabalhosas e necessitarem de instrumentação complexa e técnica aprimorada quando comparadas a outras técnicas analíticas (Abbott et al., 2010).

O *kit* que é utilizado para averiguar a inexistência de resíduos de leite é do fabricante *NEOGEN* tendo como nome *Reveal for Total Milk*. Estes fornecem uma linha de produtos para

deteção rápida e simples de alérgeno: fitas de teste em tempo real usando métodos de fluxo lateral *in loco* (figura 3.1), que permitem testes rápidos e decisão imediata, especialmente quando é necessário um ciclo ou uma solução rápida do problema.



Figura 3.1: Representação esquemática do método utilizado (Romer Labs, 2012).

O *kit* utilizado tem como resultados uma avaliação visual, que pode ser positiva (se amostra contiver maior do que 5 mg/Kg de proteína de leite) ou negativa (se a amostra contiver um teor inferior de 5 mg/Kg de proteína de leite). O método utilizado está aprovado pela Companhia Coca-Cola e a especificação apresentada definida pela mesma.

Este procedimento aplica-se à sala de CIP (sala onde são realizadas as higienizações), Sala de Xaropes (onde se fabrica o xarope ou bebida) e à linha de produção. Os locais definidos para recolher as amostras foram sujeitos a validação com a Companhia Coca-Cola, sendo estes considerados os mais críticos, em termos de processo, e que mereciam um controlo de forma a averiguar se existe ou não resíduos de alérgenos. Neste trabalho os pontos de amostragem que foram aprovados para recolher anualmente, foram recolhidos sempre em duplicado, isto para que um laboratório externo (*Silliker*) analisa-se. Este laboratório é Francês mas tem representação em Vila Nova de Gaia. O método que eles utilizaram para verificar a presença de resíduos de alérgenos não nos foi facultado, sendo sigiloso. Na tabela 3.1, estão descritos todos os pontos de recolha das amostras, sendo que o tipo de amostras podem variar de local para local, assim como a água ou a zaragatoa.

Tabela 3.1: Representação dos pontos de recolha das amostras para controlo de alérgeno.

Local	Ponto de amostragem	Tipo de amostra
Sala de xaropes	Funil utilizado na adição da pectina no tanque	Zaragatoa
	Adição de pectina no interior do tanque	Zaragatoa
	Interior (meio) do tanque de adição de pectinas	Zaragatoa
	Parede mais próxima do tanque de adição de pectinas.	Zaragatoa
	Saída do tubo de drenagem do tanque adição de pectina	Água
	Retirar a amostra tanque do xarope / bebida terminada	Água
	CIP retorno da válvula de saída de xarope de tanques	Água
	Dumper saída do homogeneizador	Água
	Válvulas homogeneizador – desmontar	Zaragatoa
	Interior boca do tanque após homogeneizar	Zaragatoa
	Retirar amostra do tanque posterior homogeneizador	Água
	Retirar amostra no tubo que envia o xarope para a linha de enchimento	Água
	Tubo de chegada de bebida á linha	Água
	Tubo de saída do tanque da linha, de bebida terminada	Água
	Válvula da enchedora	Água

SALA DE ENCHIMENTO DO VIDRO	Válvula da enchedora 3x	Zaragatoas
	Banhos do pasteurizador (4)	Água (descalcificada ou recuperada)
	Água dos banhos renovada.	Água (descalcificada ou recuperada)
	Superfície das garrafas após passagem no pasteurizador.	Zaragatoa
SALA DE CIP	Retorno CIP tanque 3 (xaropes) Água recuperada	Água
	Retorno CIP tanque 1 o 2 (linhas) Água recuperada	Água
AMOSTRAS DO PRODUTO	Controlo positivo - MM Duofrutas	Produto
	Controlo negativo LEITE – primeiro enchimento depois da limpeza posterior ao fabrico do Duofrutas.	Produto

3.1 Material, equipamento e reagentes

Os materiais necessários para a validação de resíduos de proteínas do leite no sumo de fruta são: o banho previamente aquecido a 60°C, micropipeta de 100 µL, pontas para a micropipeta, funil, relógio, provetas graduadas (5 -100 mL), zaragatoas, frasco de vidro de 1000 mL, frascos/copos esterilizados, água destilada e o *Kit de Alergeno Reveal for Total Milk* que contém:

- 24 Tiras de teste de fluxo lateral de leite num tubo selado e permanecer num local seco;
- 24 microcopos de reagentes;
- 1 Frasco de diluente de amostra;
- 1 Frasco de extracção de aditivo;
- 1 Colher de plástico para medir o extracto do aditivo;
- 3 Saquetas de 10 mM PBS (Phosphate Buffered Saline), de extracção de pó seco com solvente, cada bolsa contém pó suficiente para preparar 1L de solução de extracção;

3.2 Modo Operatório

3.2.1 Águas

Deita-se uma saqueta do aditivo de extração num litro de água destilada e pré aquece-se a 60°C. Da amostra recolhida, retiram-se 10 mL para um frasco de 250 mL. Neste adiciona-se uma colher de aditivo de extração do leite. Depois de também se adicionam 90 mL da solução tampão de extração pré-aquecida e agita-se vigorosamente durante 3 minutos. Adicionam-se 100 µL de diluente nos microcopos. Do frasco, depois de agitado, são retirados 100 µL, e misturados de cima para baixo 3 vezes com a micropipeta. Por fim insere-se uma tira teste e deixa-se repousar 5 minutos.

Observa-se então a fita e caso ocorra a formação de uma linha na zona de teste e outra linha na zona de controlo, a amostra é positiva (figura 3.2), o significa que ocorre um teor superior a 5 mg/Kg de proteína do leite na amostra. Caso, após cinco minutos, apenas exista uma linha visível na zona de controlo, a amostra é negativa (figura 3.2), e portanto há menos que 5 mg/Kg de proteína do leite na amostra. Se não houver nenhuma linha na zona de controlo, o teste é inválido.



Figura 3.2: Ilustração do resultado positivo (com duas linhas vermelhas) e de um resultado negativo (apenas uma linha vermelha).

3.2.2 Zaragatoas

Deita-se uma saqueta do aditivo de extração num litro de água destilada e pré-aquece-se a 60°C. Prepara-se a solução de trabalho através da mistura de 125 mL de solução de extração pré-aquecida, e uma colher aditivo para um frasco limpo. Recolhem-se as amostras com as zaragatoas devidamente identificadas, usando um dos seguintes métodos:

- Para superfícies secas: Abrem-se as zaragatoas e humedecem-se na solução tampão de extração. Limpa-se com a zaragatoa uma área de 10 x 10cm.
- Para superfícies molhadas: Abrem-se uma nova zaragatoa e limpa-se uma área de 10 x 10cm.

Retira-se a zaragatoa do tubo, e adicionam-se 5 mL de solução de trabalho para cada tubo, e agita-se durante 2 minutos. Depois adicionam-se 100µL de diluente aos microcopos.

Nesses microcopos depois adiciona-se 100µL da amostra, e mistura-se de cima para baixo 3 vezes com a micropipeta. Por fim insere-se uma tira teste do leite e deixa-se repousar por 5 minutos. Caso se forme uma linha na zona de teste e outra linha na zona de controlo, a amostra é positiva. Se, após cinco minutos, apenas existe uma linha visível na zona de controlo, a amostra é negativa. Se não houver nenhuma linha na zona de controlo, o teste é inválido (figura 32).

Atente-se que as observações das tiras devem ser feitas entre 5 e 6 minutos. As observações após seis minutos podem não ser precisas, devido a excesso de desenvolvimento do dispositivo.

Ao preparar a solução de extração, esta deve ser bem agitada. Qualquer porção desta, não utilizada deve ser bem fechada e refrigerada entre 2-8°C. A solução de extração deve ser pré-aquecida (60°C) sempre antes da extração.

Devem descartar-se as porções não utilizadas da solução de extração quando o *kit* do teste for usado completamente.

4. Resultados

Os limites relativos à validação dos resíduos de proteína do leite, definidos pela Companhia Coca-Cola, pelo laboratório externo (Silliker) e os utilizados internamente (Refrige) apresentam-se na tabela 4.1.

Tabela 4.1: Representação dos valores limite estabelecidos, pela companhia Coca-Cola, laboratório externo e interno.

	Amostra (ppm)		Produto final (ppm)
	Água	Zaragatoa	
Requisitos da Coca-Cola	< 5	< 5	< 2,5
<i>Reveal for Total Milk</i>	< 5	< 5	<5
Silliker (Lab. Externo)	< 2,5	< 2,5	< 2,5

Nas tabelas 4.2, 4.3, 4.4 e 4.5 estão referenciados os resultados obtidos dos resíduos de leite, no primeiro enchimento, na Refrige.

Tabela 4.2: Resultados na Sala de Xaropes após o primeiro enchimento do sumo com leite.

SALA DE XAROPES		
AMOSTRA		RESULTADOS
Ponto de amostragem	Tipo	Refrige
Funil utilizado na adição da pectina no tanque	Zaragatoa	< 5 mg/Kg
Tanque de adição de pectina - Interior da boca	Zaragatoa	< 5 mg/Kg
Tanque de adição de pectina - Meio	Zaragatoa	< 5 mg/Kg
Tanque de adição de pectina - Parede mais próxima	Zaragatoa	< 5 mg/Kg

Tanque adição de pectina - Saída do tubo de drenagem	Água	< 5 mg/Kg
Tanque de bebida terminada - Amostra da purga	Água	< 5 mg/Kg
Retorno da válvula de saída do tanque de bebida	Água	< 5 mg/Kg
Dumper saída do homogeneizador	Água	< 5 mg/Kg
Válvulas homogeneizador	Zaragatoa	< 5 mg/Kg
Tanque homogeneizador - Interior da boca	Zaragatoa	< 5 mg/Kg
Tanque homogeneizador - Purga exterior	Água	< 5 mg/Kg
Purga no tubo de envio da bebida para a linha	Água	< 5 mg/Kg

Tabela 4.3: Resultados na Sala de Enchimento após o primeiro enchimento do sumo com leite.

SALA DE ENCHIMENTO		
AMOSTRA		RESULTADOS
Ponto de amostragem	Tipo	Refrige
Tubo que chega à linha com a bebida - Purga no tubo	Água	< 5 mg/Kg
Tubo de saída do tanque da linha, com a bebida - Purga no tubo	Água	< 5 mg/Kg
Enchedora - Válvula	Água	< 5 mg/Kg
Enchedora - Válvula	3 Zaragatoas	< 5 mg/Kg
Banhos do pasteurizador - Banho nº4	Água Descalcificada	< 5 mg/Kg

Tabela 4.4: Resultados na Sala de CIP após o primeiro enchimento do sumo com leite.

SALA DE CIP		
AMOSTRA		RESULTADOS
Ponto de amostragem	Tipo	Refrige
Retorno CIP do xarope - Tanque 3	Água	< 5 mg/Kg
Retorno CIP da linha - Tanque 1	Água	< 5 mg/Kg
Retorno do CIP do tanque das pectinas	Água	< 5 mg/Kg

Tabela 4.5: Resultados dos produtos após o primeiro enchimento do sumo com leite.

PRODUTO		
AMOSTRA		RESULTADOS
Ponto de amostragem	Tipo	Refrige
MM Duofrutas Tropical	Bebida	< 5 mg/Kg
Primeiro enchimento depois da higienização da linha. Garrafas de bebida.	Bebida	< 5 mg/Kg

Após vários enchimentos, foram realizados várias avaliações de resíduos de leite com o kit *Reveal for Total Milk*, onde se verificou, que os resultados eram sempre negativos (inferiores a 5 mg/Kg) tirando o do controlo positivo. Os pontos de amostragem foram reduzidos, de acordo com histórico de resultados, para o controlo de alérgeno. Sendo que, ficou estabelecido que por cada ano seriam recolhidos, em triplicado, três conjuntos de amostras (amostragem maior), sendo um para análise no laboratório da Refrige, outro para análise em laboratório externo e outro para armazenar no laboratório da Refrige para possíveis confirmações. Os pontos de recolha das amostras ao serem reduzidos, foram escolhidos tendo em conta os pontos mais críticos, ou seja, onde pode haver maior risco da presença de alérgeno e de acordo com o

procedimento da Companhia Coca-Cola. Assim, os novos pontos de amostragem a serem recolhidos estão descritos na tabela 4.6.

Tabela 4.6: Representação dos novos pontos de recolha de amostras para a validação de resíduos de leite.

SALA DE XAROPES	
Ponto de amostragem	Tipo
Tanque adição de pectina - Saída do tubo de drenagem	Água
Tanque de bebida terminada - Amostra da purga	Água
Tanque homogeneizador - Purga exterior	Água
SALA DE ENCHIMENTO	
Ponto de amostragem	Tipo
Enchedora – Válvula	Água
PRODUTO	
Ponto de amostragem	Tipo
Primeiro enchimento depois da higienização da linha: 3 Garrafas de bebida.	Bebida

Na tabela 4.7, estão descritos todos os resultados obtidos internamente durante o ano de 2011. Na tabela 4.8 estão enumerados os resultados do ano de 2012. Por fim na tabela 4.9 estão expostos os resultados da recolha da amostragem anual entre o laboratório externo e o nosso.

Tabela 4.7: Resultados ao longo do ano de 2011, da validação de resíduos de leite.

AMOSTRA		Resultados ao longo do ano de 2011 da Refrige – Validação de resíduos de Leite (mg/Kg)								
Ponto de amostragem	Tipo	01 de Abril	10 e 17 de Maio	24 de Junho	08 de Julho	10 e 23 Agosto	08 de Setembro	06, 11 e 28 de Outubro	4 e 7 de Novembro	22 de Dezembro
Tanque adição de pectina - Saída do tubo de drenagem	Agua	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
Tanque de bebida terminada - Amostra da purga	Agua	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
Tanque homogeneizador - Purga exterior	Agua	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
Enchedora - Válvula	Agua	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
Primeiro enchimento depois da higienização da linha, 3 garrafas de bebida	Bebida	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5

Tabela 4.8: Resultados ao longo do ano de 2012, da validação de resíduos de leite.

AMOSTRA		Resultados ao longo do ano de 2012 (dia-mês) – Validação de resíduos de Leite (mg/Kg)			
Ponto de amostragem	Tipo	23 de Fevereiro	08 de Junho	30 de Julho	12 de Dezembro
Tanque adição de pectina - Saída do tubo de drenagem	Água	< 5	< 5	< 5	< 5
Tanque de bebida terminada - Amostra da purga	Água	< 5	< 5	< 5	< 5
Tanque homogeneizador - Purga exterior	Água	< 5	< 5	< 5	< 5
Enchedora – Válvula	Água	< 5	< 5	< 5	< 5
Primeiro enchimento depois da higienização da linha. 3 Garrafas de bebida.	Bebida	< 5	< 5	< 5	< 5

Tabela 4.9: Resultados da validação anual (do ano 2011 e 2012) da Refrige e do laboratório externo.

Amostra		Validação anual (2011) de resíduos de Leite (mg/Kg)		Validação anual (2012) de resíduos de Leite (mg/Kg)	
Ponto de amostragem	Tipo	Internos: Refrige	Externos: Silliker	Internos: Refrige	Externos: Silliker
Funil utilizado na adição da pectina no tanque	Zaragatoa	< 5	<2.5	< 5	<2.5
Tanque de adição de pectina - Interior da boca	Zaragatoa	< 5	<2.5	< 5	<2.5
Tanque de adição de pectina - Meio	Zaragatoa	< 5	<2.5	< 5	<2.5
Tanque de adição de pectina - Parede mais próxima	Zaragatoa	< 5	<2.5	< 5	<2.5
Tanque adição de pectina - Saída do tubo de drenagem	Água	< 5	<2.5	< 5	<2.5
Tanque de bebida terminada - Amostra da purga	Água	< 5	<2.5	< 5	<2.5
Retorno da válvula de saída do tanque de bebida	Água	< 5	<2.5	< 5	<2.5
Dumper saída do homogeneizador	Água	< 5	<2.5	< 5	<2.5
Válvulas homogeneizador	Zaragatoa	< 5	<2.5	< 5	<2.5

Continuação da tabela 4.9

Tanque homogeneizador - Interior da boca	Zaragatoa	< 5	<2.5	< 5	<2.5
Tanque homogeneizador - Purga exterior	Água	< 5	<2.5	< 5	<2.5
Tubo que envia a bebida para a linha de enchimento - Purga no tubo de envio da bebida para a linha	Água	< 5	<2.5	< 5	<2.5
Tubo que chega à linha com a bebida - Purga no tubo	Água	< 5	<2.5	< 5	<2.5
Tubo de saída do tanque da linha, com a bebida - Purga no tubo	Água	< 5	<2.5	< 5	<2.5
Enchedora – Válvula	Água	< 5	<2.5	< 5	<2.5
Enchedora – Válvula	3 Zaragatoas	< 5	<2.5	< 5	<2.5
Banhos do pasteurizador - Banho nº4	Água Descalcificada	< 5	<2.5	< 5	<2.5
Retorno CIP do xarope - Tanque 3	Água	< 5	<2.5	< 5	<2.5
Retorno CIP da linha - Tanque 1	Água	< 5	<2.5	< 5	<2.5
Retorno do CIP do tanque das pectinas	Água	< 5	<2.5	< 5	<2.5
Primeiro enchimento depois da higienização da linha.	Bebida	< 5	<2.5	< 5	<2.5

5. Discussão

Foram realizados quinze validações no ano de 2011, dos dois sumos que contém leite. Em relação aos resultados das catorze validações desse ano, com a amostragem reduzida, pode-se verificar que os resultados foram todos inferiores a 5ppm (tabela 4.7) ou seja, pelo método qualitativo utilizado é considerado um resultado negativo. Estes resultados estão de acordo com os critérios estabelecidos pela companhia Coca-Cola (sendo estes menor do que 5 ppm). Os resultados da amostragem completa enviada para o laboratório externo, em comparação com os nossos resultados também são concordantes, uma vez que, eles utilizam a mesma técnica (Elisa), mas o respectivo *kit* tem valores limites mais baixos, o que é melhor para averiguar até que ponto os resíduos de leite são superiores a 2,5 ppm na amostragem. Assim, mesmo com este limite mais baixo de resíduos de proteínas do leite, podemos verificar que a amostragem é sempre inferior a 2,5 ppm e nas zaragatoas é provada a ausência de proteínas do leite.

Em relação ao ano de 2012, foram realizados cinco análises aos resíduos de proteínas do leite. Pode verificar-se que os resultados foram todos sempre inferiores a 5 ppm (tabela 4.8). Os resultados anuais da amostragem recolhida para os laboratórios externo e interno foram também iguais ao do ano anterior (tabela 4.9), o que se pode dizer que as desinfecções nos equipamentos e CIP, realizado foram bem efetuadas.

Foi comprovado pelos dois laboratórios, que a bebida a ser produzida, após o CIP da bebida com leite, não continha resíduos de leite.

Constatou-se também que a técnica utilizada, reverte para um método qualitativo, não sendo portanto tão rigoroso, mas para o objetivo pretendido é o ideal, por ser um método onde se obtém um rápido resultado.

Aponte-se ainda que ambos os métodos utilizados pelos laboratórios (interno e externo) são métodos qualitativos, porem o laboratório externo é mais sensível, uma vez que, o valor do limite de detecção é mais baixo (inferior a 2,5 ppm) enquanto que, o do laboratório interno é inferior a 5 ppm.

6. Conclusão

A prevalência das doenças alérgicas tem vindo a aumentar progressivamente nas últimas décadas, entre estas doenças alérgicas, destaca-se a alergia alimentar cuja consequência pode ser ligeira ou, até mesmo, fatal. Até o momento, não existe nenhum tipo de medicamento específico para prevenir a alergia alimentar. Uma vez diagnosticada, são utilizados medicamentos específicos para o tratamento dos sintomas sendo de extrema importância fornecer orientações ao paciente e familiares para que se evite novos contatos com o alimento alérgico. As indicações devem ser fornecidas, visando à substituição do alimento alérgico. O paciente deve estar sempre atento, e verificar o rótulo dos alimentos industrializados procurando identificar nomes relacionados ao alimento que lhe desencadeou a alergia. O consumidor está cada vez mais atento e preocupado com os benefícios dos alimentos que consome. Neste sentido é importante perceber qual a importância da presença do leite na dieta. A análise bibliográfica deste trabalho evidência a existência de alguma controvérsia no que respeita ao consumo de leite, no entanto, o leite é considerado nutricionalmente como um alimento bastante completo, e que aliado a outros alimentos permite uma alimentação de qualidade e equilibrada. Neste trabalho, evidenciou-se que as proteínas do leite desencadeiam uma reação alérgica, sendo então importante numa fábrica que produz sumos que contêm leite e que não o contêm, ter certos cuidados ao longo e após enchimento deste, para não haver contaminações cruzadas. Sendo que os sítios que necessitam de mais cuidados é a sala de fabrico de xaropes, a sala de enchimento e o armazém. A formação é essencial para os todos os trabalhadores que manuseiam este tipo de produtos.

A nível laboratorial é necessário garantir que as higienizações dos equipamentos e as boas práticas de fabrico são efetuadas corretamente. Desta forma, para garantir estas é necessário a utilização de metodologias rápidas, sensíveis e confiáveis para detetarem as proteínas do leite. Descrevemos na abordagem, um teste rápido para detetar as proteínas do leite (*kit “reveal total milk”*), embora esta metodologia permita rápida análise das amostras, exhibe limitada especificidade, permitindo apenas que se avalie a amostra de forma qualitativa.

7. Bibliografia

- Abbott, M.; Hayward, S.; Ross, W.; Godefroy, S. B., 2010. Validation Procedures for Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices. Journal of AOAC international, 93 (2), p. 442-450
- Adamo, P. J. D.; Whitney, C. A., 2005. Dieta do tipo sanguíneo. Para prevenção e tratamentos das alergias, o programa ideal para cada tipo de sanguíneo. Campus-Elsevier. Rio de Janeiro. ISBN: 85-352-1741-x. p. 15-32
- Angelis, R. C., 2006. Alergias alimentares: tentando entender por que existem pessoas sensíveis a determinados alimentos. Atheneu. São Paulo, Brasil. p. 12-38.
- Allen, K. J.; Hill, D. J.; Heine, R. G., 2006. Food allergy in childhood. Mja practice essentials – allergy. 185(7) p. 394-400.
- Bahna, S. L., 2002 Cow's milk allergy versus cow milk intolerance. Ann Allergy Asthma Immunol. 89(6 Suppl 1) p. 56-60.
- Brill, H., 2008. Approach to milk protein allergy in infants. Can Fam Physician. 54(9), p. 1258-64.
- Campos, L., 2002. Entender a bioquímica. 3ª Edição. Lisboa: Escolar Editora. p.684.
- Clariant, 2012. Aditivos & Ingredientes. Disponível em: <<http://docentes.esalq.usp.br/luagallo/proteinas2.pdf>>. Consulta efetuada em 10 de Maio de 2012.
- Crevel, R.W. R.; Briggs, D.; Hefle, S. L.; Knulst, A.C.; Taylor, S. L., 2007. Hazard characterisation in food allergen risk assessment: The application of statistical approaches and the use of clinical data. Department of Food Science and Technology and Food Allergy Research and Resource Program, University of Nebraska, Lincoln, USA.
- Crittenden, R. G.; Bennett, L. E., 2005. Cow's milk allergy: a complex disorder. Journal of the American College of Nutrition 24: 582-587.
- DIRECTIVA 2000/13/CE DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 20 de Março de 2000 relativa à aproximação das legislações dos Estados-Membros respeitantes à rotulagem, apresentação e publicidade dos géneros alimentícios. Disponível em: <http://eurlex.europa.eu/pri/pt/oj/dat/2000/l_109/l_10920000506pt00290042.pdf>. Consulta efetuada em 28 de Dezembro 2012.
- DIRECTIVA 2003/89/CE DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 10 de Novembro de 2003 que altera a Directiva 2000/13/CE relativamente à indicação dos ingredientes presentes nos géneros alimentícios. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/food/labellingnutrition/foodlabelling/fl_com2003-89_pt.pdf>. Consulta efetuada em 28 de Dezembro 2012

- DIRECTIVA 2007/68/CE DA COMISSÃO de 27 de Novembro de 2007 que altera o anexo III A da Directiva 2000/13/CE do Parlamento Europeu e do Conselho no que respeita a determinados ingredientes alimentares. Disponível em:<<http://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=web&cd=1&ved=0CDAQFjAA&url=http%3A%2F%2Feurlex.europa.eu%2FLEXUriServ%2FLEXUriServ.do%3Furi%3DOJ%3AL%3A2007%3A310%3A0011%3A0014%3APDF&ei=OzudUtMKKKJ7AaJ7IHgDg&usq=AFQjCNGo8sotucXvVqlSiq7x4IfB9XSRFw>>. Consulta efectuada em 17 de Novembro 2013.
- EFSA, 2010. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA); Scientific Opinion on lactose thresholds in lactose intolerance and galactosaemia. EFSA Journal 8: 1777.
- Fernandes, M. E., 2005. Alergia alimentar em cães. Dissertação de Mestrado em Saúde Publica – Faculdade de Saúde Pública. Universidade de São Paulo, Brasil. p. 3-7
- Ferreira, C. T.; Seidman, E., 2007. Alergia alimentar: atualização prática do ponto de vista gastroenterológico. *Jornal de Pediatria*, 83(1): 7-20. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0021-75572007000100004&script=sci_arttext>. Consulta efetuada em 10 de Maio de 2012.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1995. Report of the FAO - Technical Committee on Food Allergies, Rome, Italy, p. 13-14.
- Fredeen, A. H., 1996. Considerations in the nutritional modification of milk composition. *Animal Feed Science and Technology*. p. 185-197.
- Pérez, J. S., 2013. Guidance on Food Allergen Management for Food Manufacturers, Food Drink Europe. p. 33-57.
- Halken, S., 2004. Prevention of allergic disease in childhood: clinical and epidemiological aspects of primary and secondary allergy prevention. *Pediatric Allergy Immunology*. 15, p. 4-9.
- Heine, R. G.; Elsayed, S.; Hosking, C. S.; Hill, D. J., 2002. Cow's milk allergy in infancy.. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2, p. 217-225.
- Hoffmann-Sommergruber K.; Mills, E N., 2009. Food allergen protein families and their structural characteristics and application in component-resolved diagnosis: new data from the EuroPrevall project. *Anal Bioanal Chem*. 395(1), p. 25-35
- Host, A.; Halken, S.; Muraro, A., 2008. Dietary prevention of allergic diseases in infants and small children. *Pediatric Allergy and Immunology*. 19, p. 1-4.
- Ivanciuc, O.; Schein, C. H.; Garcia, T.; Oezguen, N.; Negi, S. S.; Braun, W., 2009. Structural analysis of linear and conformational epitopes of allergens. *Regul Toxicol Pharmacol*. 54, p. 9-11.

- Junior, C, F, F., 2001. Apresentação clínica da alergia ao leite de vaca com sintomatologia respiratória. *Jornal de Pneumologia*, 27(1), p.17-19.
- Kanwal, R.; Ahmed, T.; Mirza, B., 2004. Comparative analysis of quality of milk collected from buffalo, cow, goat and sheep of Rawalpindi/Islamabad Region in Pakistan. *Asian Journal of Plant Sciences*. 3, p. 300-305.
- Kleinman, R, E., 2004. Food Sensitive. *Pediatric Nutrition*. 5th Ed. Elk Grove Village, American Academy of Pediatrics. p. 593-607.
- Lidon, F.; Silvestre, M. M., 2010. *Princípios de Alimentação e Nutrição Humana*. p. 445-455.
- Lopes, C.; Ravasqueira, A.; Silva, I.; Caiado, J.; Duarte, F.; Didenko, I.; Salgado, M.; Silva, S. P.; Ferrão, A.; Pité, H.; Patrício, L.; Borrego, L. M., 2006. Allergy School Hannover: Allergy, from diagnosis to treatment. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*. 14(4), p. 355-364.
- Luiz, V. F. C.; Speridião, P. G. L.; Neto, N. U., 2012. Terapia nutricional nas intolerâncias e alergias alimentares. *Electronic Journal of Pediatric Gastroenterology, Nutrition and Liver Diseases*. Disponível em: <http://www.e-gastroped.com.br/jun05/terapia_nutricional.htm>. Consulta efetuada em 10 de Outubro de 2012.
- Manual de Acolhimento da Refrige, 2010
- Manual de HACCP da Refrige S.A.
- Monaci, L.; Arjon, J.; Hengel, V., 2008. Development of a method for the quantification of whey allergen traces in mixed-fruit juices based on liquid chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*. 1192, p. 113-120
- Moreira, L. F., 2006. Estudo dos componentes nutricionais e Imunológicos na perda de peso em Camundongos com alergia alimentar. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/1843/ECJS-6XYPUT/1/let_cia_figueiredo.pdf>. Consulta efetuada em 13 de Outubro de 2012.
- Orsi, M.; Fernandez, A.; Follett, F, R.; Marchisone, S.; Saieg, G.; Busoni, V,B., 2009 .[Cow's milk protein allergy: proposed guidelines for the management of children with cow's milk protein allergy]. *Arch Argent Pediatr*. 107(5), p. 459-67.
- Panzani, R.; Ariano, R.; Mistrello, G., 2010. Cypress pollen does not cross-react to plant-derived foods. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*.42, p. 6-125.
- Pereira, A. C. S.; Moura, S. M.; Constant, P. B. L., 2008. Alergia alimentar: sistema imunológico e principais alimentos envolvidos. *Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina. 29 (2), p. 189-200.

- Portero, K. C. C.; Rodrigues, E. M., 2001. Aspectos clínicos e imunológicos da alergia alimentar. *Nutrição em Pauta*. 50, p. 41-44.
- Ramesh, S., 2008. Food allergy overview in children. *Clin Rev Allergy Immunol*. 34, p. 30-217.
- Refrige, 2012. Minute Maid. Disponível em: <[http:// www.refrige.pt](http://www.refrige.pt)>. Consulta efetuada em 23 de Dezembro de 2012.
- Romer Labs, 2012. Disponível em: <<http://www.romerlabs.com/pt/knowledge/allergens/>>. Consulta efetuada em 15 de Novembro de 2012.
- Santos, C., 2010. Tecnologias de processamento do leite, associadas à problemática do seu consumo. Dissertação de mestrado em Tecnologia dos Alimentos – Escola Superior de Engenharia – Universidade do Algarve. p. 1-50
- Teixeira, L. M. O., 2010. Alergia às Proteínas do Leite de Vaca - Cow's Milk Protein Allergy. Monografia. Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação. p. 1-12
- Thomas K, Herouet-Guicheney C, Ladics G, Bannon G, Cockburn A, Crevel R, Fitzpatrick J, Mills M, Privalle L, Vieths S., 2007. Evaluating the effect of food processing on the potential human allergenicity of novel proteins: International workshop report. *Food and Chemical Toxicology*. 45 p. 1116–1122.
- Wal, J. M., 2002. Cow's milk proteins/allergens. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 89(6 Suppl 1), p. 3-10.